

**COMPLEXES PEPTIDIQUES DU CUIVRE(II)
AVEC DES ACIDES AMINÉS.
ÉTUDES FONDÉES SUR LA PHÉNOMÉNOLOGIE
DES SYSTÈMES BIOCHIMIQUES**

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences

par

DANIEL PERRET

ingénieur chimiste diplômé de l'Université de Neuchâtel

pour l'obtention du grade de
Docteur ès Sciences



Digitized by the Internet Archive
in 2026

**COMPLEXES PEPTIDIQUES DU CUIVRE(II)
AVEC DES ACIDES AMINÉS.
ÉTUDES FONDÉES SUR LA PHÉNOMÉNOLOGIE
DES SYSTÈMES BIOCHIMIQUES**

THÈSE

présentée à la Faculté des Sciences

par

DANIEL PERRET

ingénieur chimiste diplômé de l'Université de Neuchâtel

pour l'obtention du grade de
Docteur ès Sciences

IMPRIMATUR POUR LA THÈSE

Complexes peptidiques du cuivre(II) avec des
acides aminés. Etudes fondées sur la phéno-
ménologie des systèmes biochimiques.

de Monsieur Daniel Perret

UNIVERSITÉ DE NEUCHÂTEL

FACULTÉ DES SCIENCES

La Faculté des sciences de l'Université de Neuchâtel,
sur le rapport des membres du jury,

Messieurs les professeurs P. Baccini,

K. Bernauer et A. Zuberbühler

autorise l'impression de la présente thèse.

Neuchâtel, le6 août 1980.....

Le doyen:



K. Bernauer

A Lucky

A mes parents

" Ce que l'on sait, savoir qu'on le
sait; ce qu'on ne sait pas, savoir
qu'on ne le sait pas: voilà le
véritable savoir "

Confucius

REMERCIEMENTS

=====

Ce travail a été effectué de mars 1976 à décembre 1979 dans les laboratoires de chimie inorganique de l'Université de Neuchâtel.

J'exprime ma reconnaissance à M. le prof. Baccini, directeur de thèse, pour ses conseils judicieux et didactiques, ainsi que pour son rôle de manager.

Je remercie M. le prof. Bernauer de sa constante gentillesse et de m'avoir donné la possibilité de travailler dans ses laboratoires en tant qu'assistant.

Je remercie MM. les prof. Bernauer et Zuberbühler d'avoir accepté d'être membres du jury de cette thèse.

Ma gratitude va également aux camarades du département, en particulier à Carole Luginbühl, et à Mlle Lucky Bois pour son constant soutien.

Enfin, je remercie le Fonds national suisse de l'octroi d'une bourse d'études.

TABLE DES MATIERES

=====

	<u>Page</u>
Abréviations	
1. Introduction	1
1.1 Rôle du cuivre dans les systèmes biologiques	1
1.2 Transport du cuivre dans le sérum	2
1.3 Problèmes étudiés	3
2. Buts du travail	7
2.1 Systèmes choisis	7
2.2 Atomes centraux et ligands	9
2.3 Propriétés à étudier et méthodes choisies	10
3. Description du système ion métallique-tripeptide	13
3.1 Introduction	13
3.2 Phénoménologie et résultats	13
3.3 Interprétation des résultats	21
3.3.1 Hypothèses	21
3.3.2 Distributions des espèces	24
3.3.3 Rôle de Asp en position 1 du tripeptide	25
3.3.4 Coordination du reste β -carboxylate	28
3.3.5 Rôle des substituants en position 2 et 3 du tripeptide	30
3.4 Conclusions	31
4. Description du système Cu(II)-tripeptide-acide aminé	35
4.1 Introduction	35
4.2 Phénoménologie et résultats	35
4.2.1 Etudes potentiométriques	35
4.2.2 Titrages spectrophotométriques	36
4.3 Interprétation des résultats	37

4.3.1	Hypothèses	37
4.3.2	Distribution des espèces	40
4.3.3	Rôle de Asp en position 1 du tripeptide	43
4.4	Conclusions	44
5.	Rôle du substituant 2 du tripeptide	50
5.1	Introduction	50
5.2	Phénoménologie	50
5.2.1	Constantes de formation et distributions des espèces	50
5.2.2	Phénoménologie spectrochimique	61
5.3	Interprétation stérique	64
5.4	Conclusions	71
6.	Diastéréosélectivité dans la formation des complexes ternaires	73
6.1	Introduction	73
6.2	Phénoménologie thermodynamique	74
6.3	Phénoménologie spectroscopique	79
6.4	Diastéréosélectivité thermodynamique	84
6.5	Stéréochimie des complexes ternaires	85
6.5.1	Hypothèses	85
6.5.2	Interprétation des spectres CD et VIS	87
6.6	Conclusions	39
7.	Système naturel et modèles	91
7.1	Introduction	91
7.2	Conditions du système naturel	91
7.3	Rôle de l'imidazole	94
7.4	Conclusions	97
8.	Partie expérimentale	99
8.1	Méthodes analytiques	99
8.1.1	Titrages potentiométriques	99
8.1.2	Spectres VIS	100

8.1.3 Spectres CD	100
8.1.4 Calculs par ordinateur	101
8.2 Synthèse des peptides	101
8.2.1 Organigramme	101
8.2.2 Z-Cl	102
8.2.3 Z-Asp	102
8.2.4 Z-Asp-anh.	102
8.2.5 ($\alpha + \beta$)Asp-dipeptide	102
8.2.6 Purification des peptides (α)Asp-dipeptide	103
8.2.7 Description du tripeptide (α)AspAlaGly	104
9. Résumé	107
10. Bibliographie	109

ABREVIATIONS

=====

M	ion métallique (Cu^{2+} , Ni^{2+})
L	ligand principal peptidique
X	acide aminé
(S)X, (R)X	" " de configuration S, R
C_M, C_L, C_X	concentration totale en métal, peptide, acide aminé
Ala	alanine
Pro	proline
Arg	arginine
Ser	sérine
Lys	lysine
His	histidine
AspGlyGly	α -aspartylglycylglycine
AspAlaGly	α -aspartylalanylglycine
AspGlyAla	α -aspartylglycylalanine
GlyGlyHis	glycylglycylhistidine
HSA	albumine du sérum humain
VIS	spectre d'absorption dans le visible
CD	spectre de dichroïsme circulaire
β_{mhlx}	constante globale de formation du complexe $\text{M}_m\text{H}_h\text{L}_l\text{X}_x$
$\alpha_{\text{R/S}}$	$\beta_{\text{hl}}(\text{pour (R)X}) / \beta_{\text{hl}}(\text{pour (S)X})$
ϵ	coefficient d'absorption molaire [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]
$\Delta\epsilon$	$\epsilon_L - \epsilon_D$ [$\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$]

Remarques: - l'absence de configuration des acides aminés et peptides signifie "configuration S"

- l'ordonnée des graphes de distribution des espèces indique toujours $[\text{espèce}]/C_M$

1 INTRODUCTION

=====

1.1 Rôle du cuivre dans les systèmes biologiques.

Le cuivre joue un rôle important dans les systèmes biologiques (1,2,3). Son action s'effectue généralement au moyen de protéines appelées cuproprotéines. Il existe trois types de complexes du cuivre(II) avec des protéines :

- le cuivre bleu, caractérisé par une absorption intense vers 600 nm ($\epsilon \approx 3500 - 5300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) due probablement à l'environnement particulier du Cu(II) (structure tétraédrique déformée, transitions par transfert de charge $S \rightarrow Cu$).
- le cuivre non bleu, dont les propriétés spectroscopiques sont comparables à celles des modèles de bas poids moléculaires.
- le cuivre "non détectable par EPR" qui consiste en une paire Cu(II)-Cu(II) fortement couplée qui n'est pas paramagnétique et qui peut accepter deux électrons.

Une molécule de protéine peut coordonner parfois plusieurs atomes de cuivre (par exemple la céruloplasmine) ou une seule (par exemple l'albumine).

Le cuivre est nécessaire dans certains processus métaboliques tels que transport d'oxygène, transfert d'électrons, catalyse oxydative.

Les processus mettent en jeu des réactions rédox qui sont favorisées par le potentiel rédox bas du Cu(II) et par le couple Cu(I)-Cu(II) beaucoup plus favorable que celui des autres métaux de transition.

Un autre aspect de la chimie des peptides consiste en l'accessibilité aux complexes du cuivre(III) (5). En effet, le potentiel standard E^0 du couple Cu(III)-Cu(II) de complexes peptidiques (peptides de plus de quatre acides aminés) en solution aqueuse légèrement basique est de l'ordre de 0.7 V. Ainsi, une telle stabilisation du Cu(III) par des liaisons peptidiques déprotonnées pourraient jouer un rôle dans la nature.

1.2 Transport du cuivre dans le sérum

Le mécanisme du transport du cuivre jusqu'à l'intérieur des cellules n'est pas encore entièrement élucidé. Chez les bovins et chez l'homme (pour qui la question du transport du cuivre est la plus étudiée), le sérum représente le fluide par lequel le cuivre est amené dans les tissus. Dans le sérum humain, la majeure partie du cuivre est liée à la protéine céruloplasmine et n'est pas échangeable "in vivo" ⁽²⁾. Seulement une petite fraction du cuivre dans le sang (environ 5%) est liée à l'albumine et à des acides aminés (mais essentiellement à l'histidine). Seule cette fraction est en équilibre rapide avec le cuivre(II) dans les tissus. Un complexe ternaire du type histidine-cuivre(II)-albumine joue un rôle essentiel dans l'échange du cuivre entre la macromolécule albumine et l'acide aminé de bas poids moléculaire (histidine) qui peut être facilement transporté à travers les membranes biologiques ⁽¹²⁾. Sarkar a proposé un ensemble d'équilibres (figure 1) qui ont une signification importante dans les mécanismes du transport du cuivre ⁽⁴⁾.

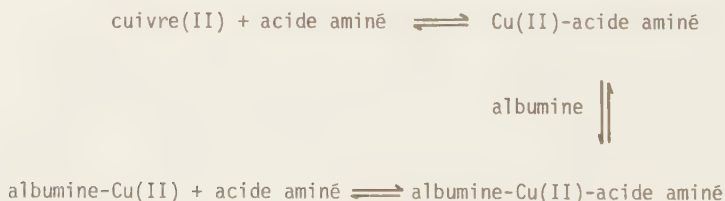


Figure 1

L'étude du site actif de l'albumine a suscité de nombreux travaux. Parmi ceux-ci, des modèles simplifiés ont été créés afin de mieux comprendre le système naturel ainsi que les propriétés thermody-

namiques des complexes du cuivre(II). Les modèles les plus étudiés comprennent les ions Cu^{2+} , Ni^{2+} et les ligands glycine et polyglycine (7,10), des dipeptides (8,11), les peptides glycyglycylhistidine (9,13) et son dérivé N-méthylamide (14,15,18) avec l'histidine (16), et le tripeptide Aspartylalanylhistidine N-méthylamide (12,19).

Le site actif de l'albumine humaine comprend la séquence NH_2 terminale : AspAlaHis- (1,4). Il fait intervenir l'amine du résidu aspartyl, deux azotes peptidiques et l'imidazole de l'histidine en position 3. En position 4, le résidu Lys ne semble plus jouer de rôle. En présence de cuivre(II), seule l'histidine (en l'occurrence la (S)His) peut être liée à l'albumine. Les acides aminés Gly, Leu, Phe en sont incapables.

1.3 Problèmes étudiés

Du point de vue de la chimie de coordination bioinorganique, de nombreux problèmes restent posés relativement au site actif du système cuivre(II)-albumine-histidine. On connaît, bien sûr, la structure des complexes cuivre(II)-peptide et des liaisons ion métallique-N-peptide, l'existence de complexes ternaires avec des acides aminés, les caractéristiques spectroscopiques et thermodynamiques des systèmes.

Mais il ressort mal de la littérature le rôle des substituants du peptide et de l'acide aminé, le choix du cuivre(II), l'importance des atomes coordinateurs et les possibilités de structures des complexes peptidiques.

Le rôle des substituants du peptide et de l'acide aminé pose plusieurs types de problèmes.

-Le pH joue un rôle primordial dans les systèmes naturels, et souvent très subtilement. Dans les systèmes simplifiés, comment le pH influence-t-il les structures et les propriétés physiques

des complexes ternaires (en fonction des restes du peptide et de l'acide aminé) ?

- La formation des complexes ternaires est-elle favorisée ou défavorisée par rapport aux prédictions statistiques ?

- Quel est le rôle de Asp en position un du peptide ? Les systèmes comprenant Gly en position un (et His en position 3) semblent montrer des caractéristiques semblables à celles du système naturel. Quel est le rôle de la coordination axiale du reste β -carboxylate ? Influence-t-elle la stabilité et la structure des complexes ternaires ?

- Les peptides et les acides aminés, en tant que ligands du Cu(II), ont tendance à se coordonner selon une structure planaire. Les atomes coordonneurs azotés sont favorisés dans le plan, tandis que les positions axiales, plus allongées (octaèdre déformé) sont occupées par des atomes d'oxygène (eau, carboxylate) ⁽³⁾. Une position axiale, occupée par le β -carboxylate (de Asp), peut-elle être permutée par un acide aminé ?

- Le rôle du deuxième acide aminé du peptide semble jouer un rôle particulier ^(20,21,22). Quel est son influence sur la stabilité et les structures des complexes ternaires ?

- Quelles influences peut engendrer un substituant simple en position 3 du peptide à la place de His ?

- Le comportement d'acides aminés autres que Gly et His est peu étudié. Que devient le cuivre(II) en présence de peptides simples et différents acides aminés (avec des restes aliphatiques, chargés ou non, volumineux, etc.) ?

- L'histidine se différencie des autres acides aminés essentiellement par son reste imidazole. Peut-on estimer cette différenciation également relativement aux structures et aux propriétés physiques des complexes binaires et ternaires ?

- Une autre question concerne la diastéréosélectivité ⁽²³⁾. En

effet, les systèmes naturels ont souvent un comportement stéréospécifique. Par contre, des phénomènes de stéréosélectivité sont souvent observés dans les systèmes simplifiés.

Dans nos systèmes comprenant des peptides, des acides aminés et des ions métalliques, peut-on observer une différence dans les structures et les propriétés physiques (thermodynamiques et spectroscopiques) des complexes ternaires suivant la configuration de l'acide aminé vis-à-vis d'une matrice ion métallique-peptide ? Dans quelle mesure le pH et les substituants du peptide et de l'acide aminé ont-ils une influence ?

2 BUTS DU TRAVAIL

=====

2.1 Systèmes choisis

Les deux buts du travail sont d'étudier un système simple pour élucider les questions principales posées au paragraphe 1.3 et de développer un modèle. Le système ne doit pas nécessairement ressembler au système naturel étudié, mais doit être adapté aux méthodes d'analyse disponibles et aux questions que l'on se pose. Nous sommes donc intéressé par des complexes du cuivre(II) avec des peptides et des acides aminés (complexes binaires et ternaires). Nous pouvons représenter schématiquement l'équilibre global qui relie un complexe binaire (ion métallique-peptide) et un complexe ternaire (ion métallique-peptide-acide aminé) de deux façons (figure 2a, 2b).



Figure 2a

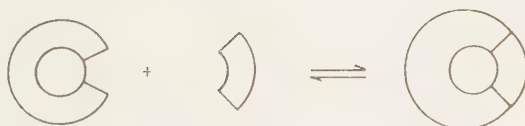


Figure 2b

Dans le cas de la figure 2a, la matrice ML ne change pas de structure. Par contre, dans la figure 2b, le ligand L change son mode de coordination (atomes coordinateurs différents).

Notre système doit posséder un ligand principal L peptidique susceptible d'occuper quatre positions dans le plan du complexe. Un tripeptide peut le faire (figure 3a). Bien que des peptides de plus de trois acides aminés puissent entourer l'ion par quatre azotes (figure 3b), un tripeptide a justement l'avantage d'avoir un groupe carboxylate coordonné qui peut, mieux qu'un N-peptide, s'échanger contre un azote d'un ligand secondaire X. En principe, l'occupation d'une cinquième position de coordination permettrait de restreindre les possibilités de coordination de X (figure 3c). Cette figure montre un blocage d'une position axiale par une bifurcation portant une fonction carboxylate.

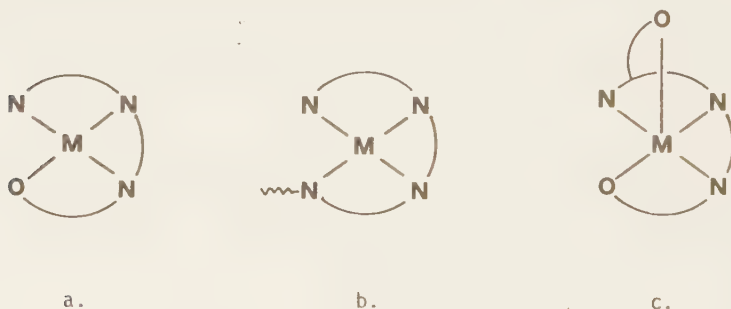


Figure 3

A priori, un ligand secondaire peut perturber un complexe ion métallique-peptide selon le schéma de la figure 4. Ces voies réactionnelles sont fonction du pH.

Dans les réactions a,b,c et d, le ligand peptidique change son mode de coordination (schéma de la figure 2b), tandis que dans les réactions e et f, le ligand secondaire occupe des positions libres du complexe métal-peptide (schéma de la fig. 2a).

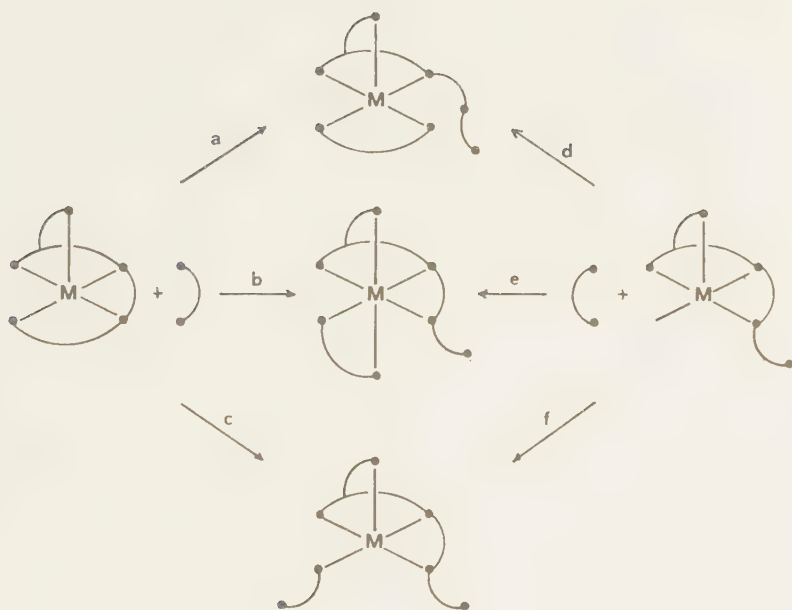


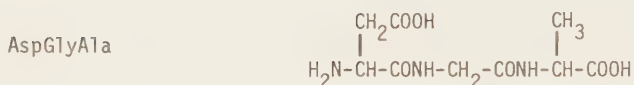
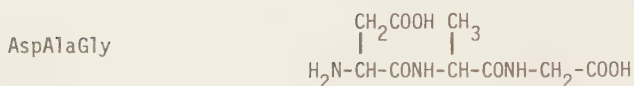
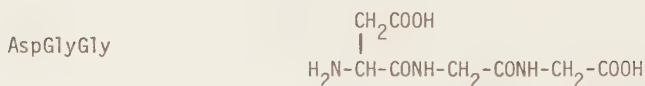
Figure 4

2.2 Atomes centraux et ligands

Il ressort de ce qui précède que l'acide aminé Asp en position 1 du tripeptide soit judicieux (occupation d'une position axiale par un oxygène et analogie avec l'albumine).

Les restes en positions 2 et 3 seront soit -H, soit -CH₃. Nous nous limiterons à d'éventuels effets purement stériques. Il s'agit ainsi d'une simplification (His en position 3 remplacé par Gly ou Ala). Nous renonçons aux variations des groupes R d'un point de vue économique et supposons que l'effet stérique soit significatif. S'il l'est, il devrait être observable même avec R = CH₃.

Nous utiliserons ainsi les peptides suivant :



Quant aux acides aminés, nous avons choisi Ala (acide aminé simple), Pro (amine secondaire), Ser (reste polaire, possibilité de liaison H), Arg (reste chargé positivement), et Lys (reste aminé).

L'ion métallique sera essentiellement le Cu^{2+} du fait de son rôle biologique. Mais nous consacrerons quelques études aux complexes du nickel(II) afin de comparer deux types de géométrie : pyramide tétragonale ou octaèdre déformé du cuivre(II) ^(3,24) et carré plan du nickel(II) diamagnétique ⁽⁴³⁾.

2.3 Propriétés à étudier et méthodes choisies

Deux aspects du problème nous intéressent : a) stabilité et diversité des espèces, b) stéréochimie.

Nous aborderons le premier aspect essentiellement à partir des mesures potentiométriques. Ce moyen nous informe efficacement sur les espèces en solution en fonction du pH et sur les constantes d'équilibres. L'ordinateur sera un autre moyen d'étudier les équilibres par des simulations. Les paramètres seront les substituants du tripeptide, les acides aminés, les groupes coordinateurs et le pH.

La stéréochimie sera étudiée par des mesures spectroscopiques (VIS et CD) et potentiométriques. Les combinaisons de ces mesures permettent de discuter les problèmes de structures, d'isoméries dans les complexes ternaires labiles. De plus, l'interprétation de la diastéréosélectivité sera également une méthode analytique pour élucider les structures. Les paramètres, en plus de ceux indiqués pour l'aspect thermodynamique, seront les configurations des acides aminés.

3 DESCRIPTION DU SYSTEME ION METALLIQUE - TRIPEPTIDE

=====

3.1 Introduction

Le but de ce chapitre est de décrire ce qui caractérise un système Cu^{2+} -tripeptide en fonction du pH (distribution des espèces, caractéristiques spectrales et structures) lorsque le ligand est ramifié. Des mesures spectroscopiques et potentiométriques, ainsi que des comparaisons avec des systèmes comprenant un ligand linéaire (Gly-GlyGly) ou le Ni^{2+} , permettront de discuter le rôle de la ramification (reste β -carboxylate) et les structures plausibles de chaque complexe.

3.2 Phénoménologie et résultats

La figure 5 montre les courbes de titrage des systèmes Cu(II)-Asp-GlyGly 1:1 et Ni(II)-AspGlyGly 1:1 dans les conditions $C_M = C_L = 2.8 \text{ mM}$ et $\mu = 0.1 \text{ M NaClO}_4$ à $T = 25^\circ$.

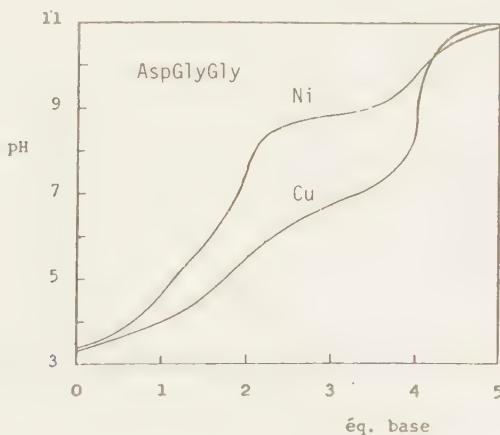


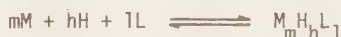
Figure 5

Sur les deux courbes, deux domaines sont visibles. Le premier (0-2 éq.) correspond à la neutralisation d'une fonction acide carboxylique et de l'ammonium terminal, tandis que le deuxième domaine (2-4 éq.) est dû à la coordination des deux N-peptides. Dans le cas du nickel, cette dernière se fait presque simultanément, si bien que la courbe de titrage montre un remarquable effet tampon.

Nous avons calculé les constantes de formation de chaque espèce du système à l'aide des programmes SCOGS et COMICS ^(32,33) modifiés ⁽³⁴⁾. Les constantes sont définies de la façon suivante :

$$\beta_{mhl} = \frac{[M_m H_h L_l]}{[M]^m * [H]^h * [L]^l}$$

relativement à l'équation générale :



Nous avons calculé les constantes de formation β_{mhl} des complexes $MH_h L_l$ simultanément pour un ensemble de trois solutions dont les compositions sont indiquées dans le tableau 1.

Cu ²⁺	AspGlyGly		AspAlaGly		AspGlyAla	
	C _M (mM)	C _L	C _M (mM)	C _L	C _M (mM)	C _L
1	6.10	12.20	4.07	8.13	6.09	6.15
2	6.09	6.15	6.10	6.22	6.10	12.20
3	6.10	6.16	6.09	6.09	6.10	6.22

Tableau 1: conditions expérimentales (systèmes Cu(II)-tripeptide)
($\mu = 0.1$ M KNO₃ , T = 25⁰)

Le tableau 2 donne les valeurs β_{mh1} et parfois pKa de toutes les espèces dont nous avons tenu compte dans les calculs. Le tableau 3 reproduit des valeurs de la littérature, ainsi que celles du système Ni^{2+} -AspGlyGly.

Les constantes d'acidité des complexes nous seront plus utiles que les valeurs $\log \beta_{mh1}$ dont les valeurs sont très sensibles à leur erreur. Par contre, les différences entre les constantes $\log \beta$ (pKa) sont beaucoup plus significatives.

L'utilisation des valeurs des tableaux 2 et 3 nous a permis de calculer les distributions de toutes les espèces en fonction du pH pour des concentrations $C_M = C_L = 5$ mM (figures 6 et 7 respectivement). Nous constatons que seule l'espèce ML_2 , parmi les bis-complexes, n'est pas à négliger. Mais nous verrons plus loin, dans les systèmes ternaires, que les concentrations de $M(H_1L)L$ et $M(H_1L)_2$ ne seront plus négligeables, car une partie du cuivre est complexée par l'acide aminé sous forme de biscomplexe, ce qui rend le ligand L excédentaire.

Etudes spectroscopiques

Nous avons effectué, par spectrophotométrie dans le visible, des titrages des solutions contenant Cu^{2+}/Ni^{2+} -AspGlyGly. Les spectres calculés en ϵ apparents sont dessinés dans les figures 8A et 9A, tandis que les courbes 8B et 9B montrent les variations de ϵ apparent en fonction des équivalents de base ajoutés, à $\lambda = 550$ nm (Cu^{2+}) et à $\lambda = 430$ nm (Ni^{2+}). Les spectres mesurés sont la somme, en général, de la contribution de plusieurs espèces. Ainsi, la légende des figures 8 et 9 indique la composition des solutions pour quelques valeurs d'équivalents de base ajoutés.

Cependant, les distributions des espèces (figures 6 et 7) des systèmes contenant le cuivre(II) montrent que les solutions, vers pH = 9, contiennent essentiellement le complexe $M(H_2L)$ qui est l'espèce dominante en milieu basique et neutre. Les mesures spectroscopiques avec de telles solutions permettent donc de caractériser

espèces	formule	AspGlyGly $\log \beta_{mh1}$ (s)	pKa	AspAlaGly $\log \beta_{mh1}$ (s)	pKa	AspGlyAla $\log \beta_{mh1}$ (s)	pKa
0 3 1	H ₃ L	14.21	2.76	14.21	2.78	14.37	2.87
0 2 1	H ₂ L	11.45	3.65	11.63	3.79	11.50	3.65
0 1 1	HL	7.80	7.80	7.84	7.84	7.85	7.85
1 1 1	M(HL)	9.55 (.03)	3.37	9.86 (.03)	3.63	9.79 (.02)	3.55
1 0 1	ML	6.18 (.01)	6.30	6.23 (.01)	6.18	6.24 (.01)	6.19
1 -1 1	M(H ₋₁ L)	-0.12 (.01)	7.17	0.05 (.01)	6.81	0.05 (.01)	7.11
1 -2 1	M(H ₋₂ L)	-7.29 (.01)	12.03	-6.76 (.01)	12.38	-7.06 (.01)	12.57
1 -3 1	M(H ₋₂ L)OH	-19.32 (.02)	-	-19.14 (.03)	-	-19.63 (.06)	-
1 0 2	ML ₂	10.74 (.02)	7.41	10.82 (.04)	-	10.90 (.02)	7.36
1 -1 2	M(H ₋₁ L)L	3.33 (.03)	8.90	-	-	3.54 (.03)	8.58
1 -2 2	M(H ₋₁ L) ₂	-5.57 (.11)	-	-	-	-5.04 (.05)	-

Tableau 2 (s = déviation standard, $\mu = 0.1$ M KNO₃, T = 25°)

M = cuivre(II)

espèce	formule	Cu-GlyGlyGly $\log \beta^{(40)}_{pKa}$	Ni-GlyGlyGly $\log \beta^{(40)}_{pKa}$	Ni-AspGlyGly $\log \beta_{pKa}$
0 3 1	H ₃ L	-	-	14.21 -
0 2 1	H ₂ L	11.09 3.20	11.09 3.30	11.45 3.65
0 1 1	HL	7.89 7.89	7.89 7.89	7.80 7.80
1 1 1	M(HL)	9.38 4.30	10.28 6.53	9.55 4.58
1 0 1	ML	5.08 5.11	3.70 8.83	4.97 10.52
1 -1 1	M(H ₋₁ L)	-0.03 6.72	-5.13 7.77	-5.55 7.06
1 -2 1	M(H ₋₂ L)	-6.75 11.80	-12.90 12.8	-12.61 11.1
1 -3 1	M(H ₋₂ L)OH	-18.25 -	-25.70 -	-23.71 -
1 0 2	ML ₂	10.17 *	6.73 -	8.41 -
1 -1 2	M(H ₋₁ L)L	3.91 *	-	-
1 -2 2	M(H ₋₁ L) ₂	-4.81 *	-	-

Tableau 3 ($\mu = 0.1$ M KNO₃, T = 25°, * : $\mu = 3$ M)

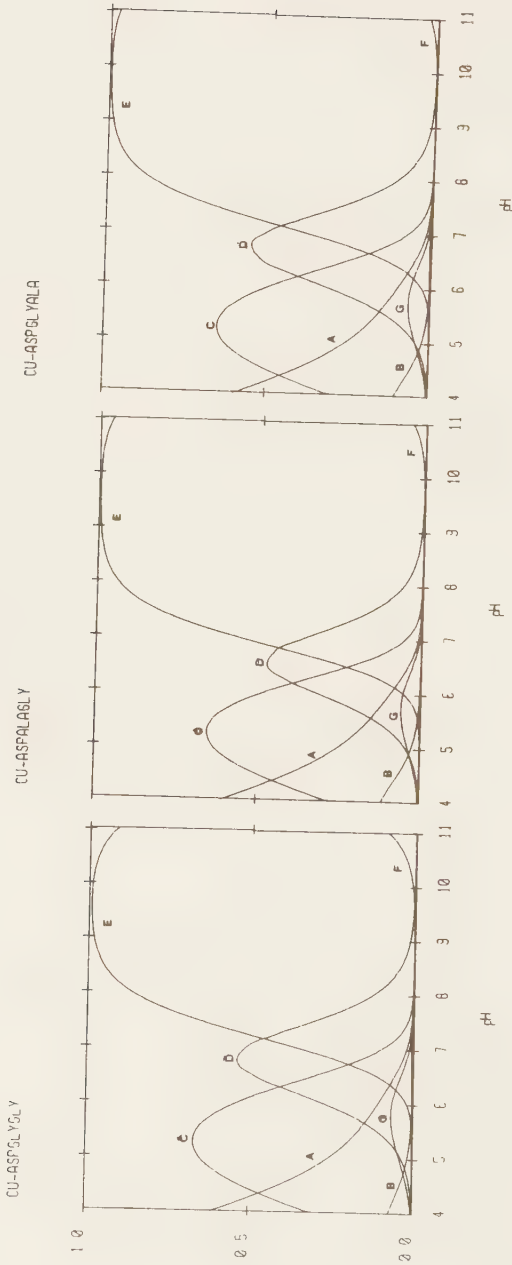


Figure 6 : systèmes Cu(II)-tripeptide ($C_M = C_L = 5 \text{ mM}$, $\mu = 0.1 \text{ M KNO}_3$, $T = 25^\circ$)

A Cu^{2+} , B M(HL) , C ML , D $\text{M(H}_2\text{L)}$, E $\text{M(H}_2\text{L)}$, F $\text{M(H}_2\text{L)OH}$, G ML_2

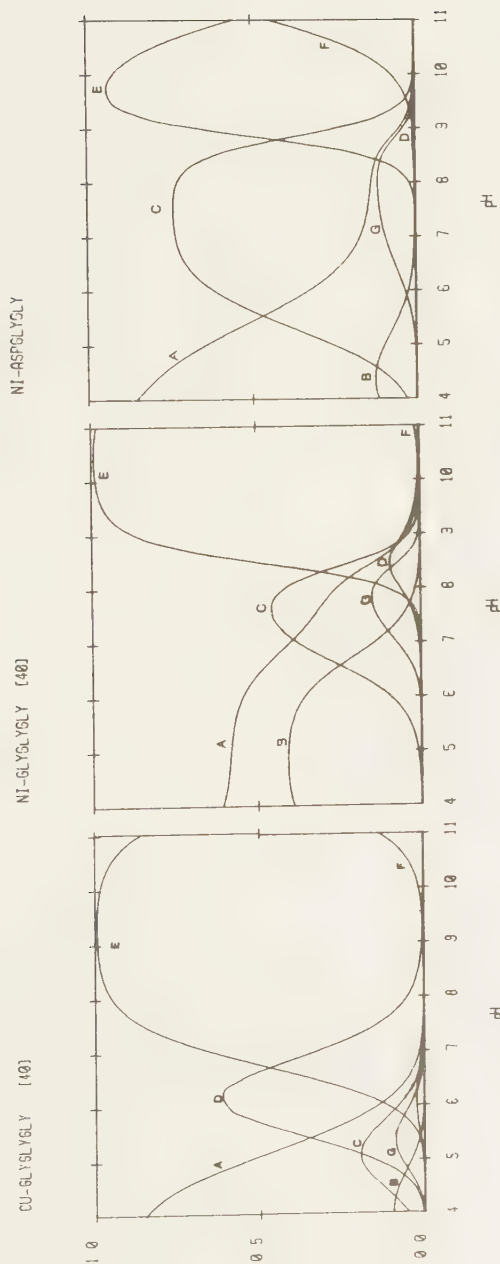


Figure 7 A M^{2+} , B $M(HL)$, C ML , D $M(H_1L)$, E $M(H_2L)$, F $M(H_2L)OH$, G ML_2

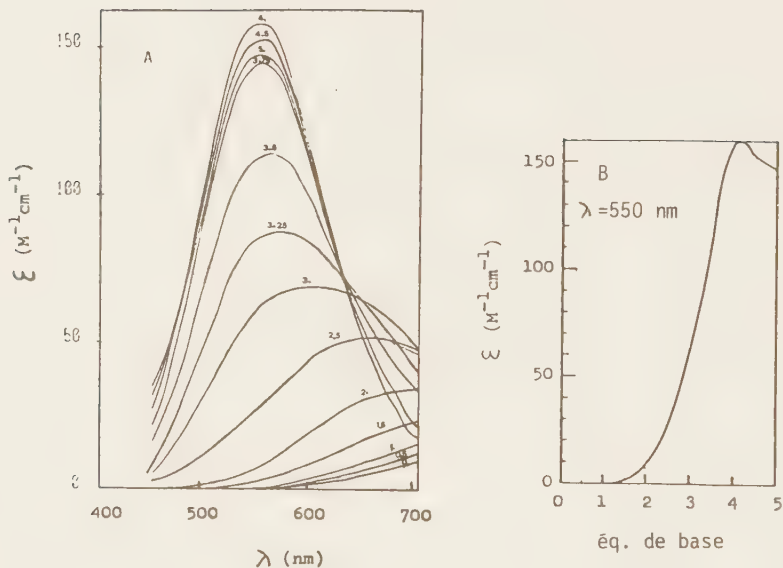


Figure 8 : titrage spectrophotométrique de Cu(II)-AspGlyGly 1:1

éq.	pH	abondance des espèces principales (%)
2	5.6	ML 68, M 20, $M(H_{-1}L)$ 7
3	6.9	$M(H_{-1}L)$ 55, ML 20, $M(H_{-2}L)$ 20
4	9.	$M(H_{-2}L)$ 99
5	11.1	$M(H_{-2}L)$ 92, $M(H_{-2}L)OH$ 8

directement cette espèce.

Les propriétés spectroscopiques (VIS, CD, EPR) des complexes du cuivre(II) sont sensibles à la nature des ligands. Les figures 10 et 11 montrent les spectres CD et VIS des complexes $M(H_{-2}L)$. Les spectres EPR, ainsi que leurs caractéristiques, des complexes $[Cu(H_{-2}AspGlyGly)]^{2-}$ et $[Cu(H_{-2}GlyGlyGly)]^{-}$ sont identiques (figure 12).

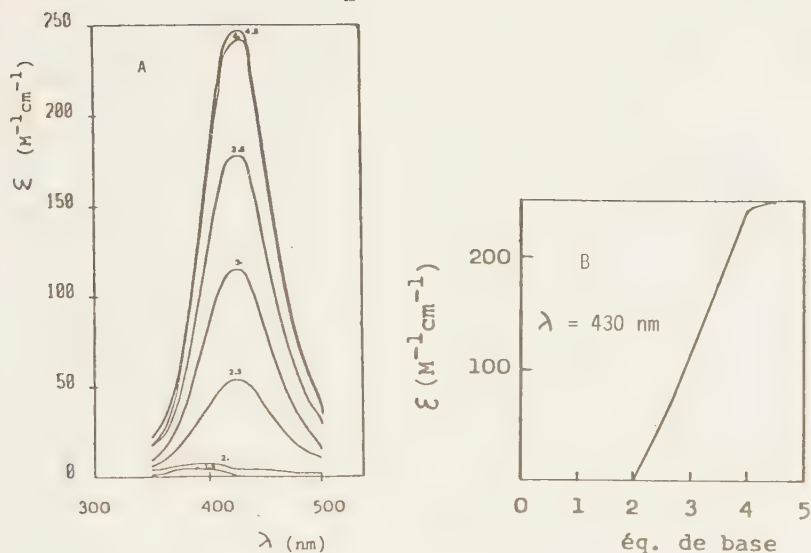


Figure 9 : titrage spectrophotométrique de Ni(II)-AspGlyGly 1:1

éq.	pH	abondance des espèces principales
2	7.7	ML 75, M 15, ML_2 12
3	8.8	ML 42, $m(H_{-2}L)$ 42, M 8, ML_2 7
4	9.8	$M(H_{-2}L)$ 95
5	10.9	$M(H_{-2}L)$ 57, $M(H_{-2}L)OH$ 43

3.3 Interprétation des résultats

3.3.1 Hypothèses

Les structures des complexes peptidiques du cuivre(II) et du nickel(II), mais aussi du palladium(II) et cobalt(II), ont été étudiées abondamment durant ces vingt dernières années ^(7,27). Il ressort que les complexes du cuivre(II) et du nickel(II) avec un tripeptide sont semblables, du moins en ce qui concerne les complexes MH_nL .

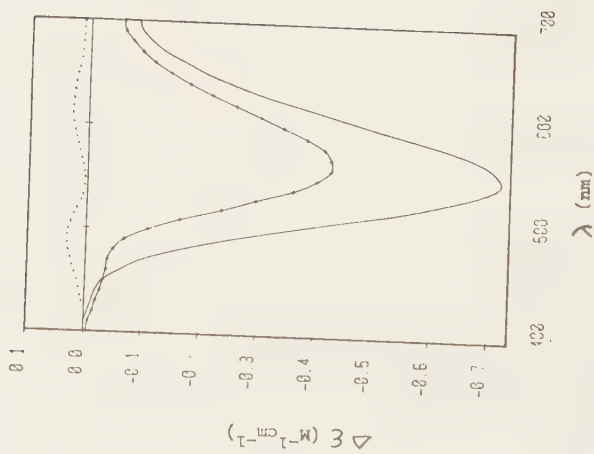


Figure 10 : spectres CD de $M(H_2L)$

L= AspGlyGly (.....), AspAlaGly (—),
AspGlyAla (+-----)

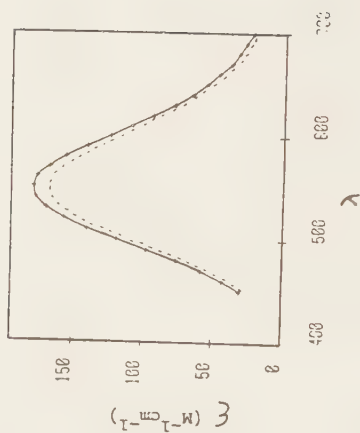


Figure 11 : spectres VIS de $M(H_2L)$

L= AspGlyGly, AspAlaGly (-----)
AspGlyAla (+-----)

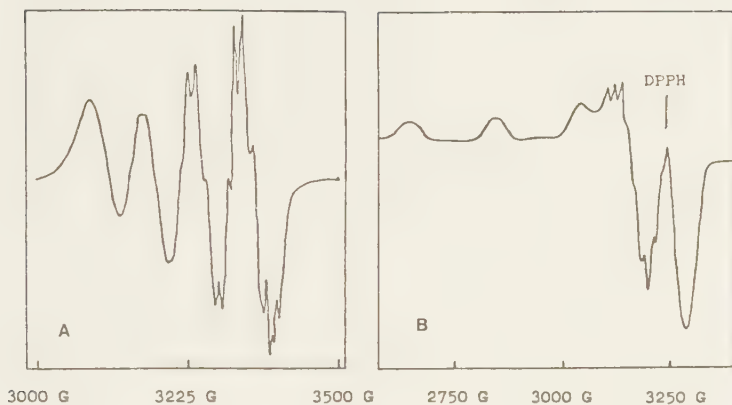


Figure 12 : spectres EPR de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{AspGlyGly})]^{2-}$
(identiques à ceux de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{GlyGlyGly})]^-$)

A : $\nu = 9.54 \text{ GHz}$ $T = 25^\circ$
B : $\nu = 9.12 \text{ GHz}$ $T = -170^\circ$

$$\begin{aligned} g_0 &= 2.11 & A_0 &= 82.2 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \\ g_{//} &= 2.21 & A_{//} &= 206.4 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \\ g_{\perp} &= 2.06 & A_{\perp} &= 20.1 \cdot 10^{-4} \text{ cm}^{-1} \\ & & A_N &= 21.2 \text{ G} \end{aligned}$$

Nos ligands (dérivés de l'acide aspartique) se différencient des tripeptides linéaires par un reste β -carboxylate. Nous supposons que le reste β -carboxylate est coordonné et que la composition des espèces reste inchangée.

.3.2 Distributions des espèces

Le calcul des constantes $\log \beta_{\text{mhl}}$, ainsi que le choix de celles-ci satisfont les mesures potentiométriques (tableaux 2 et 3, figures 6 et 7). Les titrages spectrophotométriques n'informent pas sur la composition des espèces de façon aussi fine que les titrages potentiométriques, mais ils permettent de supporter les hypothèses faites sur les espèces (souvent sans les prouver).

Les complexes du cuivre(II) présents dans nos systèmes diffèrent tous fortement par leur coefficient et leur longueur d'onde du maximum d'absorption ($\epsilon \lambda_{\text{max}}$). Les études sur les chromophores du cuivre(II) (30,31) permettent d'estimer par la règle "de l'environnement moyen" λ_{max} :

$$\nu_{\text{observé}} = n_a \nu_a + n_b \nu_b + n_c \nu_c + n_d \nu_d$$

où $\sum n = 4$ atomes coordinateurs du carré plan, et les valeurs de chaque contribution valent :

$$\nu_{\text{N}}(\text{peptide}) = 4.85 \text{ kK}$$

$$\nu_{\text{N}}(\text{amino}) = 4.53 \text{ kK}$$

$$\nu_{\text{O}}(\text{carboxylate}) = 3.42 \text{ kK}$$

$$\nu_{\text{O}}(\text{carbonyle, eau, OH}^-) = 3.01 \text{ kK}$$

Les coordinations axiales font décroître l'énergie de transition et produisent un abaissement d'environ 1 kK pour les fonctions hydroxyles, carboxylates et amines.

Ainsi, dans un système cuivre(II)-tripeptide, les changements de pH produisent une grande variation des spectres dans le visible. Une analyse des spectres mesurés à plusieurs pH permet de calculer les spectres de chaque complexe. Martin et al. ont trouvé, pour le système cuivre(II)-triglycine, les valeurs suivantes (ϵ_{max} et λ_{max}) M(HL) 31 (758), ML 33 (741), M(H₋₁L) 75 (654), M(H₋₂L) 144 (546) (41). La figure 8A montre les spectres VIS des solutions en fonction des équivalents de base ajoutés. Ils sont, généralement, la somme des contributions de plusieurs complexes (légende de la figure 8).

L'addition de 3 - 4 équivalents de base transforme $M(H_1L)$ en $M(H_2L)$, et un point isosbestique vers $\lambda = 630$ nm s'observe. A 4 équivalents de base, la solution ne contient que $M(H_2L)$. La décroissance de ϵ et l'apparition d'un deuxième point isosbestique vers $\lambda = 470$ nm pour 4 - 5 équivalents de base montre la formation de l'hydroxocomplexe. La figure 8B montre bien le domaine de formation de $M(H_2L)$ dont le pouvoir absorbant est le plus grand de toutes les espèces.

La figure 9 montre l'évolution des spectres VIS du système $Ni(II)$ -AspGlyGly. Pour 0 - 2 équivalents de base, les spectres sont petits. Il s'agit de mélanges d'espèces paramagnétiques. Par contre, à partir de 2 équivalents de base, les espèces pâles font place essentiellement à $M(H_2L)$ jaune et diamagnétique. C'est la raison pour laquelle les courbes sont semblables. A 4 équivalents, l'abondance de $M(H_2L)$ ne vaut pas 100 %, si bien que l'absorption augmente avec l'excès de base. Avec 4.5 équivalents de base, l'abondance en complexes diamagnétiques (y-compris l'hydroxocomplexe) vaut 100 %. La figure 8B montre bien l'apparition de $M(H_2L)$ quasiment linéairement.

3.3.3 Rôle de Asp en position 1 du tripeptide

Du point de vue phénoménologique, le rôle de Asp est manifeste (figures 6 et 7). L'abondance du cuivre(II) libre est diminuée d'environ 30 % en milieu acide. Ceci est dû à l'augmentation de l'abondance de ML de façon importante. Quant aux abondances de $M(H_1L)$ et $M(H_2L)$, elles sont comparables. Il faut noter toutefois que les courbes de la figure 6 (systèmes comprenant des ligands dérivés de Asp) sont légèrement décalées vers les pH alcalins d'environ une demi unité par rapport à celles de la figure 7. Ces observations sont liées à des différences des constantes $\log \beta_{mh1}$.

Considérons les complexes principaux pris séparément. L'import-

tante stabilisation de l'espèce ML par le bras β -carboxylate s'interprète facilement. Les constantes de formation $\log \beta_{101}$ du tableau 2 (ligands avec ramification) sont supérieures à celles du tableau 3 d'environ 1.1 unité log, ce qui correspond à une différence d'environ 6.0 kJ/mole. Le ligand ramifié est tridenté (N-amino, O-carbonyle, O-carboxylate) contrairement aux ligands linéaires. La coordination de O-carboxylate, dont l'énergie du champ cristallin est plus grande que celle de O-carbonyle (cf. 3.3.2), peut soit remplacer celle de O-carbonyle, soit offrir une dent supplémentaire.

La situation change nettement pour les complexes $M(H_1L)$ et $M(H_2L)$ dont le caractère plan carré prédomine. Le chélate possède 3 ou 4 dents dans le plan et deux ou trois azotes coordonneurs (à champ de ligand fort). Leur constante de formation à partir de M et L dépendent du pH. Mais, à un pH donné (par exemple 7), les différences d'énergie de formation des complexes à ligands ramifiés ou linéaires peuvent être calculées à partir des constantes $\log \beta_{1hl}$.

Dans le cas du complexe $M(H_1L)$, nous constatons (tableaux 2 et 3) que les valeurs $\log \beta_{1-11}$ des complexes à ligand ramifié ou linéaire sont égaux à plus ou moins 0.1 unité log. L'énergie standard de formation à pH = 7, ΔG_7^0 est de l'ordre de -40 kJ/mole. Si une différence d'énergie d'environ 6 kJ/mole (cas de ML) n'est pas détectée ici, c'est que la position axiale de la coordination du bras β -carboxylate (axe z) est mineure vis-à-vis des positions du plan. Une estimation de cette relation peut être faite en comparant la contribution à l'énergie du champ de ligand de O-carboxylate (<1 kK) à celle des dents du plan (environ 15.8 kK). Ces considérations d'ordre énergétiques ne veulent pas dire que le reste β -carboxylate n'est pas coordonné.

Les valeurs $\log \beta_{1-21}$ du complexe $M(H_2L)$ à ligand ramifié sont inférieures de 0 - 0.5 unité log. à celles des ligands linéaires

(cf. tableaux 2 et 3). Le bras β -carboxylate semble plutôt déstabiliser légèrement le complexe (relativement aux ligands linéaires). A pH = 9, l'énergie standard de formation de $M(H_2L)$ ΔG_9^0 vaut -61.1 kJ/mole pour AspGlyGly et -64.1 kJ/mole pour GlyGlyGly. Une différence de 3. kJ/mole est donc faible vis-à-vis de ΔG_9^0 et influence pas l'abondance de $M(H_2L)$.

La relation entre la coordination du reste β -carboxylate dans le complexe ML (champ cristallin faible) et l'importance du champ de ligands du plan carré du complexe $M(H_2L)$ est encore plus marquée dans les systèmes qui contiennent le nickel(II).

Les courbes de titrage (figure 5) sont distantes de 1 à 2.5 unités pH dans le domaine de 1 - 4 équivalents de base ajoutée. Cela se traduit, dans la figure 7, par un déplacement des maximums des courbes de distributions de 1 - 2.5 unités pH plus élevées pour les complexes du nickel. Cette situation est courante, et peut être discutée en termes de LFSE ⁽⁴²⁾. La différence essentielle entre le cuivre(II) et le nickel(II) réside dans leur configuration électronique. Le cuivre(II), d^9 , existe sous forme de complexes octaédriques déformés à plan carré et paramagnétiques. Par contre, la géométrie des complexes du nickel(II) peut être l'octaèdre (ou l'octaèdre déformé) ou planaire. Des mesures de susceptibilité magnétique des complexes peptidiques du nickel(II) ont montré que seuls les complexes ayant le chromophore (N-amino)-N-peptide)₂ au moins sont diamagnétiques ^(6,7).

Nous comprenons ainsi pourquoi, lors du passage de l'espèce $[CuL]$ à $[Cu(H_2L)]^{2-}$, la déprotonation et la coordination des fonctions peptidiques se fait par étapes : la géométrie des complexes change de façon continue en augmentant la force du champ des ligands du plan, mais en gardant la même configuration électronique. Par contre, dans les complexes du nickel, l'augmentation de la force du champ des ligands du plan produit un changement de la configuration électronique. Ainsi, le complexe $[Ni(H_1L)]^-$ cons-

titue une discontinuité qui se traduit par une perte de stabilité et une abondance très faible de ce complexe (tableau 3, figure 6). En ce qui concerne la coordination du reste β -carboxylate, cette dernière produit une augmentation considérable de l'abondance du complexe $[\text{NiL}]$ (augmentation du champ de ligand, effet chélate) pour un environnement octaédrique déformé, tandis que pour les complexes $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{L})]^{2-}$ et $[\text{Ni}(\text{H}_2\text{L})\text{OH}]^{3-}$ le reste β -carboxylate est certainement pas coordonné (champ de ligands fort du plan).

3.4 Coordination du reste β -carboxylate

L'analyse des mesures thermodynamiques a permis de conclure à la coordination du reste β -carboxylate dans le complexe ML, mais pas lorsque des liaisons métal-Npeptide existent.

La spectropolarimétrie CD dans le visible peut apporter de précieux renseignements concernant l'environnement du cuivre.

Les complexes avec des acides aminés naturels ont, en général, un effet Cotton négatif. Cela est vrai aussi bien pour les complexes MX_2 que peptidiques (39,44,43). De plus, les contributions de chaque cycle de chélation sont approximativement additives et la "règle de l'hexadécant" est très souvent vérifiée pour les complexes ayant des ligands chélatés dans le plan (symétrie D_{4h}) (45).

Le spectre CD de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{AlaGlyGly})]^-$ est caractérisé par $\Delta \epsilon_{\text{max}} = -0.2$ à $\lambda = 560 \text{ nm}$ (22). Par contre, l'effet Cotton de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{AspGlyGly})]^{2-}$, représenté dans la figure 10, est positif. Un tel effet Cotton positif est observé aussi pour $[\text{Cu}(\text{Asp})_2]^{2-}$ à $\lambda = 560 \text{ nm}$ et pour $[\text{Cu}(\text{AspGly})]^-$. Les valeurs positives de $\Delta \epsilon$ peuvent indiquer une chélation supplémentaire au-dessus ou au-dessous du plan (45). Dans ce cas, la règle de l'hexadécant n'est plus valable et la règle des secteurs est dérivée de l'octaèdre (43).

Le spectre observé (figure 10) peut aussi être la somme d'un spectre habituel ($\Delta \epsilon < 0$) d'une structure plane et d'un spectre d'

une structure pyramidale à base carrée.

Les spectres visibles sont également sensibles à l'environnement du cuivre(II). Nous pouvons comparer les $\epsilon_{\max}$ des spectres VIS et CD des complexes $M(H_2L)$ qui ont le même chromophore selon les axes x,y (tableau 4).

ligand	$\lambda_{\max}^{\text{VIS}}$	$\epsilon_{\max}$	$\lambda_{\max}^{\text{CD}}$
AspGlyGly	542	168	-
GlyGlyGly	555 *	149 *	-
AspAlaGly	542	169	555
GlyAlaGly	552,550 *	154 *	560
AspGlyAla	542	178	565
GlyGlyAla	550, 555 *	156 *	572

Tableau 4 : longueur d'onde des maximums d'absorption et d'effet Cotton des complexes $M(H_2L)$. (* :⁽²²⁾)

La présence du reste β -carboxylate produit un déplacement hypsochrome de 5 - 13 nm. En général, les coordinations axiales font diminuer faiblement l'énergie de transition⁽³⁰⁾. Mais il faut se rappeler que la coordination d'un tripeptide en milieu basique est particulière. $\lambda_{\max}$ calculé par la règle de l'environnement moyen (cf. 3.3.2) vaut 567 nm. Les écarts des $\lambda_{\max}$ observés peuvent s'expliquer par des liaisons M-N renforcées par un chélate tétradenté et par la géométrie des liaisons de coordination. La coordination axiale du reste β -carboxylate accentue encore la rigidité du complexe.

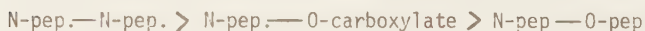
Les constantes de formation des hydroxocomplexes à ligands linéaires sont supérieures d'environ 1 unité log à celles des ligands ramifiés. Cet effet est compréhensible par le voisinage des groupes coordinateurs chargés OH^- et $\beta-COO^-$.

Les spectres EPR sont également sensibles à l'environnement du cuivre(II), essentiellement à la nature, au nombre, et à la disposition des atomes d'azote, ainsi qu'aux restes aromatiques (35, 36,37). Nous nous sommes demandé si la présence d'un reste β -carboxylate modifierait le spectre EPR de $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{GlyGlyGly})]^-$ (constantes de couplage des azotes, valeurs g, a). Nous n'avons observé aucune différence entre les spectres réalisés avec les ligands AspGlyGly et GlyGlyGly (figure 12). Ce fait ne prouve pas que le reste β -carboxylate n'est pas coordonné, car le remplacement en axial d'un oxygène de H_2O par celui de $\beta\text{-COO}^-$ modifie trop peu les propriétés magnétiques de l'environnement du cuivre(II).

3.5 Rôle des substituants en position 2 et 3 du tripeptide

Phénoménologiquement, des restes méthyles en position 2 ou 3 n'influencent guère la composition des solutions à tous les pH. La stabilité des complexes ML et $\text{M}(\text{H}_1\text{L})$ n'est pas affectée par les substituants en position 2 et 3. Les valeurs $\log \beta_{1-11}$ et $\log \beta_{101}$ sont égales à plus ou moins 0.08 unités log. Par contre les énergies standard de formation de $\text{M}(\text{H}_2\text{L})$ le sont. A pH = 9, $\Delta G_9^0 = -61.1 \text{ kJ/mole}$ (AspGlyGly), $\Delta G_9^0 = -64.1 \text{ kJ/mole}$ (AspAlaGly) et $\Delta G_9^0 = -62.4 \text{ kJ/mole}$ (AspGlyAla).

Sur la base de ces observations, nous pouvons dire, de façon qualitative, qu'un groupe méthyle stabilise la formation d'un complexe suivant les atomes coordinateurs du chélate qui porte ce groupe. Nous pouvons ainsi classer les cycles de chélation relativement à l'effet de stabilisation d'un méthyle porté par le cycle :



Cette suite n'est pas sans rappeler les énergies du champ de ligands (3.3.2). Un groupe aliphatique pourrait occasionner une stabilisation, soit par son effet inducteur +I sur les fonctions insaturées coordinatrices voisines, soit en modifiant, par son

encombrement stérique, la planarité des liaisons métal-peptide.

La substitution d'un hydrogène par un groupe méthyle en position 2 du tripeptide empêche la formation des biscomplexes $M(H_{-1}L)L$ et $M(H_{-1}L)_2$ (cf. tableau 2). Un effet semblable a déjà été observé lors d'un travail sur le complexe $M(H_{-1}L)_2$ avec des tripeptides linéaires ⁽²⁰⁾. Il est dû à un encombrement stérique en position 2 du tripeptide qui rend impossible l'isomère cis. Avec nos ligands ramifiés, une structure cis est favorisée (groupes β -carboxylates en trans), si bien qu'un effet stérique semblable est possible pour les deux complexes $M(H_{-1}L)L$ et $M(H_{-1}L)_2$.

Les méthyles en position 2 et 3 du tripeptide différencient les spectres CD et, dans une moindre mesure, les spectres VIS. Les figures 10 et 11 montrent les spectres des complexes $M(H_{-2}L)$. Les trois spectres VIS sont semblables et comparables à ceux des complexes à ligands linéaires. Les spectres CD sont semblables à ceux des complexes à ligands linéaires, sauf celui de $[Cu(H_{-2}-AspGlyGly)]^{2-}$ ⁽²²⁾ (cf. figures 10 et 11, et 3.3.4). Remarquons, une fois de plus, le rôle des atomes coordinateurs des cycles de chélation. L'amplitude de l'effet Cotton croît avec la distorsion et la rigidité des cycles :

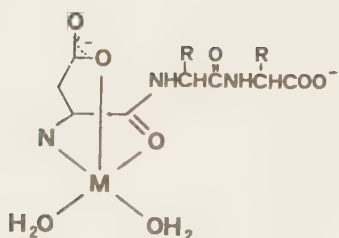


3.4 Conclusions

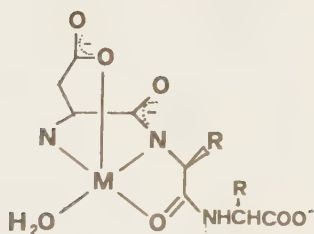
Sur la base des connaissances en chimie des complexes peptidiques et de nos observations, des propositions de structures peuvent être faites (figures 13 et 14).

Le choix des espèces et leur constante de formation satisfont les mesures potentiométriques. Les titrages spectrophotométriques n'infirmant pas la présence de chacun des complexes.

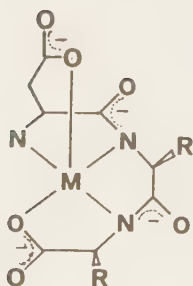
Une caractéristique des peptides en tant que ligands consiste dans le fait que lorsque le pH augmente, le ligand s'enroule



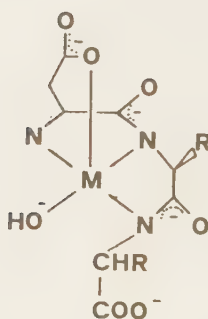
I : ML



II : $M(H_{-1}L)$



III : $M(H_{-2}L)$



IV : $M(H_{-2}L)OH$

Figure 13 : structures proposées des complexes MH_hL

(la coordination du reste β -carboxylate des complexes autres que ML n'est certainement pas complète)

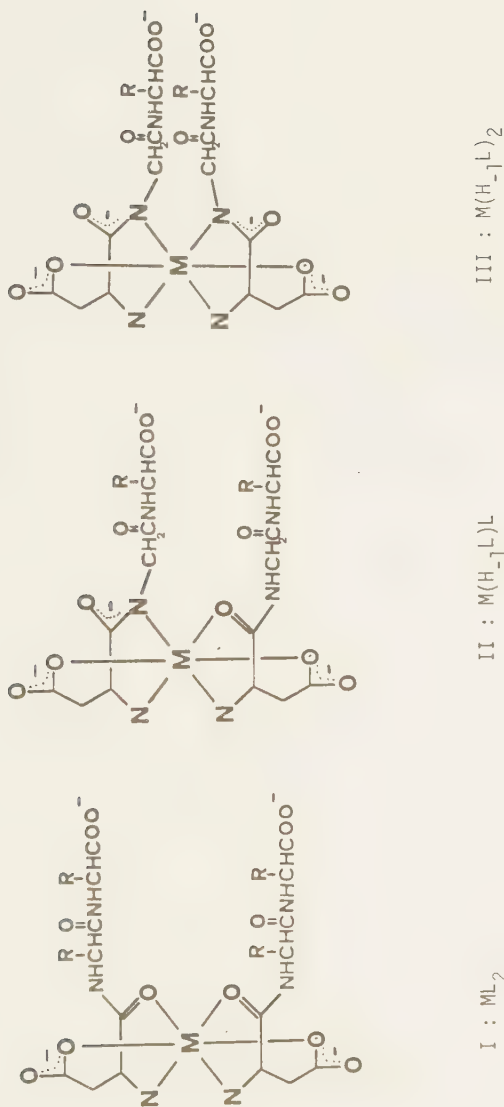


Figure 14 : structures proposées des biscomplexes MH_hL_2
(la coordination des restes β -carboxylates n'est certainement pas complète)

autour de l'ion métallique. Les N-peptides ne sont coordonnés que s'ils sont déprotonnés ^(27,29) (structure I - IV, figure 13).

Le complexe ML est fortement stabilisé par la coordination du reste β -carboxylate (structure I). La conformation est donc λ (reste en position axiale) ^(23,59).

Lorsque 1 ou 2 fonctions N-peptidiques sont coordonnées, le caractère planaire des complexes devient important et les constantes de formation ne sont que peu influencées. Cependant, les propriétés spectrales de $M(H_{-2}L)$ montrent que le reste β -carboxylate est certainement partiellement coordonné. Il l'est par conséquent également dans le complexe $M(H_{-1}L)$. La structure II a donc la conformation $\lambda\lambda$ ($\beta-COO^-$ coordonné et substituant 2 axial). Lorsque les 2 fonctions amides sont déprotonnées et coordonnées, le premier cycle de chélation peut garder sa conformation λ (reste β -carboxylate coordonné) et le deuxième cycle est quasiment planaire (structure III).

La structure de l'hydroxocomplexe (figure 13 IV) est inspirée par celle de $M(H_{-2}GlyGlyGly)OH$ ⁽²⁹⁾.

L'abondance des biscomplexes n'est pas petite que lorsque le peptide se trouve en excès par rapport à M. Les propositions de structures cis (figure 14) sont dictées par la configuration identique des deux ligands, l'inhibition des complexes $M(H_{-1}L)L$ et $M(H_{-1}L)_2$ lorsque $L = AspAlaGly$, et les conclusions de (20).

4 DESCRIPTION DU SYSTEME CU(II)-TRIPÉPTIDE-ACIDE AMINE =====

4.1 Introduction

Le but de ce chapitre est de décrire ce qui caractérise un système ion métallique-tripeptide-acide aminé en fonction du pH (distribution des espèces principales, caractéristiques spectrales et structurales) lorsque le ligand est ramifié. Des mesures potentiométriques et spectrophotométriques, ainsi que des comparaisons avec un système comprenant un ligand linéaire (Cu(II)-triglycine-Gly) ou le nickel(II), permettront de discuter le rôle de la ramification β -carboxylate et les structures plausibles des complexes ternaires.

Seuls les systèmes comprenant les ligands AspGlyGly et Ser seront décrits. Cet acide aminé offre l'avantage d'avoir un reste polaire (mais non chargé) de grandeur moyenne. De plus, en présence de nickel(II), les solutions restent limpides en milieu basique dans nos conditions expérimentales.

4.2 Phénoménologie et résultats

4.2.1 Etudes potentiométriques

La figure 15 montre les courbes de titrage des systèmes Cu(II)-AspGlyGly-Ser 1:1:1 et Ni(II)-AspGlyGly-Ser 1:1:1 dans les conditions $C_M = C_L = C_X = 3.3 \text{ mM}$, $\mu = 0.1 \text{ M NaClO}_4$, $T = 25^\circ$.

Les constantes de formation globale β_{mh1x} sont définies de la façon suivante :

$$\beta_{mh1x} = \frac{[M_m H_h L_l X_x]}{[M]^m * [H]^h * [L]^l * [X]^x}$$

relativement à l'équation générale :

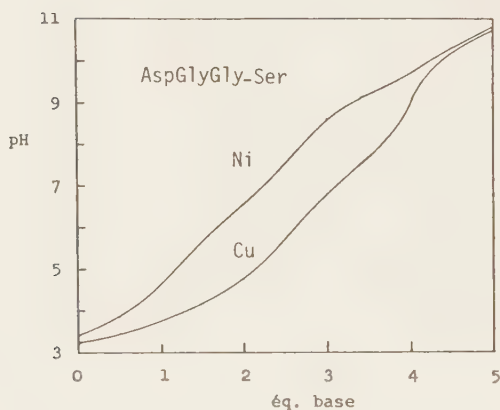
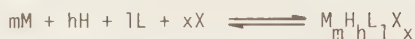


Figure 15

Nous avons calculé les constantes $\log \beta_{1011}^{(32,34)}$, $\log \beta_{1-111}$ et $\log \beta_{1-211}$ au moyen du programme SCOGS modifié.

Dans le tableau 5 figurent les constantes des systèmes Ni(II)-Asp-GlyGly-Ser et Cu(II)-GlyGlyGly-Gly de la littérature⁽¹⁰⁾.

L'utilisation des valeurs des tableaux 3, 5 et 8 nous a permis de calculer les distributions de toutes les espèces en fonction du pH pour des concentrations $C_M = C_L = C_X = 5 \text{ mM}$ (figure 16).

2.2 Titrages spectrophotométriques

Nous avons effectué, par spectrophotométrie dans le visible, des titrages de solutions contenant $\text{Cu}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ -AspGlyGly-Ser. Les spectres, calculés en ξ apparents, sont dessinés dans les figures 17A et 18A, tandis que les courbes des figures 17B et 18B montrent les variations de ξ apparent en fonction des équivalents de base ajoutée.

m h l x	formule	Ni-AspGlyGly-Ser	Cu-GlyGlyGly-Gly
		$\log \beta_{mhlx}$ ($\mu = .1M \text{ NaClO}_4$)	$\log \beta_{mhlx}^{(10)}$ ($\mu = 1M \text{ NaClO}_4$)
0 1 1 0	HL	7.86	8.16
0 2 1 0	H ₂ L	11.56	11.55
1 1 1 0	M(HL)	9.55	9.65
1 0 1 0	ML	4.97	5.30
1 -1 1 0	M(H ₋₁ L)	-5.55	-0.18
1 -2 1 0	M(H ₋₂ L)	-12.61	-6.97
1 0 1 1	MLX	9.46	12.36
1 -1 1 1	M(H ₋₁ L)X	-0.04	5.97

Tableau 5

4.3 Interprétation des résultats

4.3.1 Hypothèses

Nous avons supposé l'existence de trois complexes ternaires.

Les espèces MLX et M(H₋₁L)X ont déjà été décrites dans le système Cu(II)-GlyGlyGly-Gly⁽¹⁰⁾.

Les structures des complexes MLX et M(H₋₁L)X ont un caractère planaire (carré). L'acide aminé est chélaté dans le plan métal-peptide.

Dans le complexe M(H₋₂L)X, l'acide aminé est monodenté ou chélaté avec une position axiale.

Par analogie aux systèmes binaires, le reste β -carboxylate est coordonné dans MLX, tandis qu'il l'est partiellement dans les autres espèces.

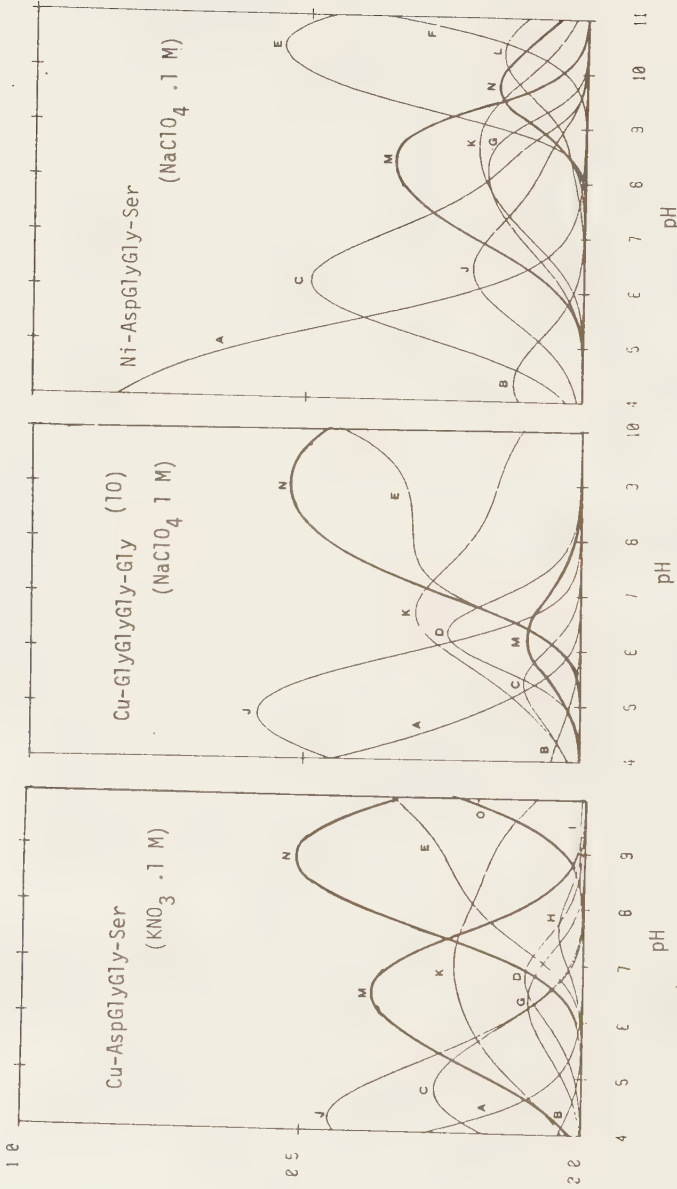
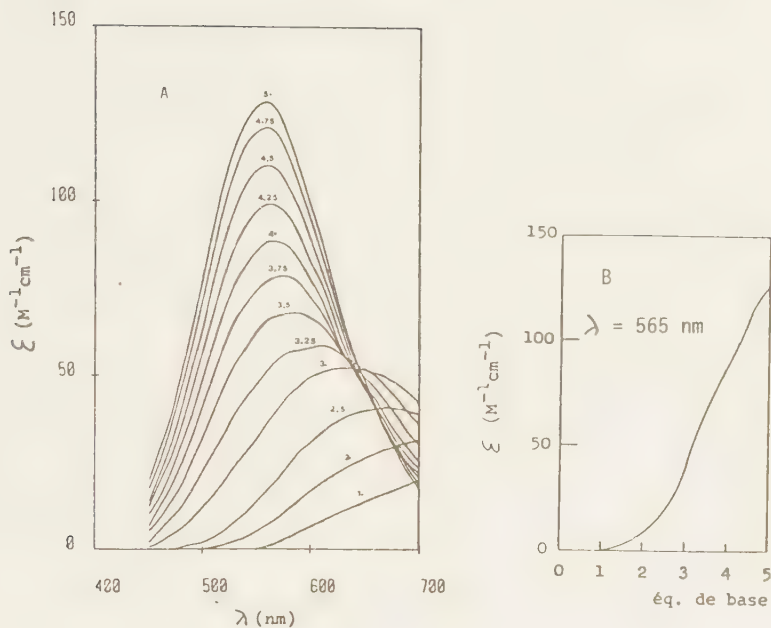
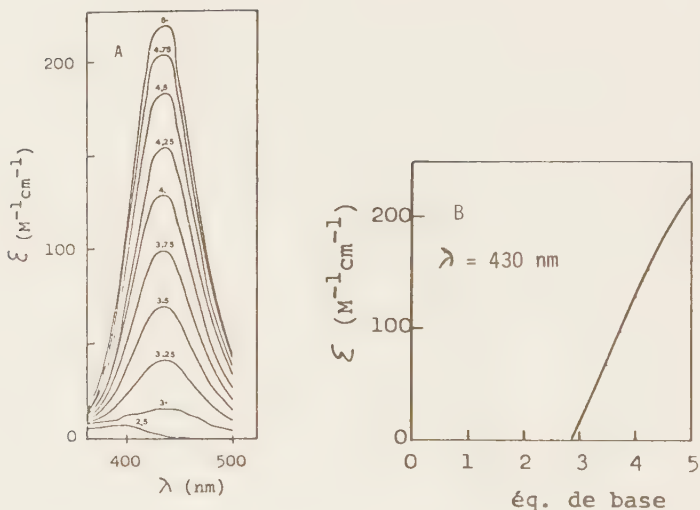


Figure 16 : A M^{2+} , B $\text{M}(\text{HL})$, C ML , D $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})$, E $\text{M}(\text{H}_{-2}\text{L})$, F $\text{M}(\text{H}_{-2}\text{L})\text{OH}$, G ML_2 , H $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})\text{L}$, I $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})_2$, J MX , K MX_2 , L MX_3 , trait renforcé: M MLX , N $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})\text{X}$, O $\text{M}(\text{H}_{-2}\text{L})\text{X}$



éq.	pH	abondance des espèces principales, % ($\mu = .1 \text{M KNO}_3$)
2	4.8	MX 40, ML 28, MLX 16, MX_2 12
3	6.8	MLX 40, MX_2 25, $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})$ 11, ML_2 10
4	9.2	$\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})\text{X}$ 54, $\text{M}(\text{H}_{-2}\text{L})$ 28, MX_2 17
4.5	10.5	$\text{M}(\text{H}_{-2}\text{L})\text{X}$ 40, $\text{M}(\text{H}_{-2}\text{L})$ 36, $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})\text{X}$ 18

Figure 17: titrage spectrophotométrique de Cu(II)-AspGlyGly-Ser
 $(C_M = C_L = C_X, \mu = .1 \text{ M NaClO}_4)$



éq.	pH	abondance des espèces principales (%)
2	6.7	ML 48, MX 20, MLX 12
3	8.8	MLX 35, MX ₂ 20, ML ₂ 18, ML 12
4	9.8	M(H ₋₂ L) 50, M(H ₋₁ L)X 16, MX ₂ 13, MX ₃ 13
5	11.0	M(H ₋₂ L) 48, M(H ₋₂ L)OH 38, MX ₃ 11

Figure 18 : titrage spectrophotométrique de Ni(II)-AspGlyGly-Ser
($C_M = C_L = C_X$, $\mu = .1 M NaClO_4$)

3.2 Distribution des espèces

Le calcul des constantes $\log \beta_{111}$, ainsi que le choix de celles-ci satisfont les mesures potentiométriques (cf. tableaux 5 et 8). Seule la détermination de $\log \beta_{1-211}$ pose un problème, car elle dépend beaucoup du système (force ionique, concentrations) et est peu sûre, à cause de l'imprécision des mesures potentiométriques à des

pH élevés. Les titrages spectrophotométriques permettent de supporter le choix des espèces et de vérifier qualitativement les distributions des espèces colorées.

En principe, une analyse détaillée des spectres VIS en fonction du pH permet de calculer les spectres de chaque espèce. Cela a été fait pour le système Cu(II)-GlyGlyGly-Gly ⁽¹⁰⁾. Les résultats ($\xi_{\max}$ et $\lambda_{\max}$) figurent dans le tableau 6 où nous incluons des valeurs de $\lambda_{\max}$ calculés en appliquant la règle de l'environnement moyen ⁽³⁰⁾.

espèce	$\xi_{\max}^{(10)}$	$\nu_{\max}^{(10)}$ (kK)	$\lambda_{\max}^{(10)}$ (nm)	$\lambda_{\text{calculé}}$
MHL	31	13.2	758	737
ML	33	13.5	741	737
M(H ₋₁ L)	75	15.3	654	649
M(H ₋₂ L)	144	18.3	546	567
MLX	41	14.4	694	646
M(H ₋₁ L)X	47	17.4	575	577

Tableau 6 : caractéristiques du système Cu(II)-GlyGlyGly-Gly ⁽¹⁰⁾

En général, les coefficients ξ augmentent avec l'intensité du champ de ligands, à l'exception de M(H₋₁L)X. Ce comportement peut s'expliquer par le fait que la série des espèces M(HL)...M(H₋₂L) correspond à une augmentation de la rigidité de la fixation du ligand au métal, ce qui n'est plus le cas de M(H₋₁L)X. De plus, des facteurs liés à la symétrie des atomes coordinateurs peuvent certainement intervenir.

Les ordres de grandeur de $\xi_{\max}$ et $\lambda_{\max}$ (tableau 6) restent valables également pour nos systèmes comprenant des ligands dérivés de l'acide aspartique.

Dans le cas du cuivre, les courbes de la figure 17 ressemblent

apparemment à celles de la figure 8. En fait, les spectres mesurés sont des sommes d'un plus grand nombre de contributions que ce ne l'était pour les systèmes binaires. La ressemblance provient du fait que l'addition de base provoque un changement du chromophore de façon semblable pour les complexes binaires et ternaires. L'addition de 3 équivalents de base correspond à la neutralisation des fonctions ammoniums et carboxylates. Vers $\lambda = 630$ nm, un point isosbestique apparent est visible (addition de 3.25 - 4 équivalents de base), bien que, dans ce domaine de pH (6 - 9), plus de deux espèces existent. Mais ce point montre la disparition de MLX en faveur de $M(H_{-1}L)X$ et $M(H_{-2}L)$ dont les chromophores CuN_3O se ressemblent à la nature près des azotes. Les autres espèces ont des concentrations soit faibles ($MH_{-1}L$, ML_2), soit presque constantes (MX_2) (cf. figure 16).

Le point isosbestique apparent à $\lambda = 630$ nm existait déjà dans la figure 8 (transformation de $M(H_{-1}L)$ en $M(H_{-2}L)$). Les spectres pour 4.25 - 5 équivalents de base se coupent par contre à $\lambda = 665$ nm. Ils correspondent à la disparition de $M(H_{-1}L)X$ en $M(H_{-2}L)$. La figure 17B représente la variation de ϵ apparent en fonction des équivalents de base ajoutés à une longueur d'onde proche de λ_{max} de $M(H_{-1}L)X$. On voit clairement la neutralisation de HX et H_2L (0 - 3 équivalents). Puis la pente de la courbe augmente fortement (apparition de $M(H_{-2}L)$) et s'infléchit à 4 équivalents (du fait de l'abondance de $M(H_{-1}L)X$ et de son ϵ_{max} plus petit que celui de $M(H_{-2}L)$).

Lorsque 4 équivalents de base sont ajoutés, la solution contient essentiellement trois complexes. Il est ainsi possible de calculer le spectre de l'espèce $M(H_{-1}L)X$ (figure 19). Le calcul de λ_{max} par la règle de l'environnement moyen donne 591 nm pour le chromophore $Cu(N\text{-amino})_2(N\text{-peptide})(O\text{-peptide})$ et 577 nm pour $Cu(N\text{-amino})_2(N\text{-peptide})(O\text{-carboxylate})$. L'observation de λ_{max} vers 580 - 590 nm ne permet pas de prouver une structure pyramidale ou planaire.

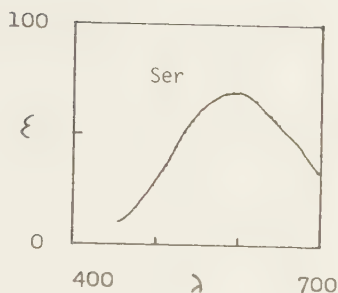


Figure 19 : spectre VIS calculé de $M(H_{-1}L)X$

L'interprétation des observations faites avec le système comprenant le nickel(II) fournit relativement peu d'information quantitative pour étudier les propriétés structurales des complexes ternaires du cuivre(II). La figure 18A montre l'évolution des spectres VIS du système Ni(II)-AspGlyGly-Ser. Bien que la distribution des espèces soit compliquée (figure 16), les spectres mesurés ne sont essentiellement que la somme de la contribution des complexes diamagnétiques, c'est-à-dire $M(H_{-2}L)$ et $M(H_{-2}L)OH$. A 4 équivalents de base, la valeur de ϵ apparent correspond à l'absorption de $M(H_{-2}L)$ seul en solution. Le complexe ternaire $M(H_{-1}L)X$ est donc paramagnétique. Ce fait n'exclut pas une structure plane des 2 cycles de chélation.

4.3.3 Rôle de Asp en position 1 du tripeptide

La comparaison des distributions des complexes des systèmes Cu(II)-AspGlyGly-Ser et Cu-GlyGlyGly>Gly (figure 16) montre que pour des pH supérieurs à 8 elles sont semblables. Les solutions contiennent essentiellement les complexes $M(H_{-1}L)X$, $M(H_{-2}L)$ et MX_2 vers pH = 8-9. Par contre, en milieu neutre ou acide, le reste β -carboxylate modifie beaucoup la phénoménologie des systèmes. Les abondances des espèces ML et MLX sont très nettement supérieures. L'effet de

la coordination du reste β -carboxylate dans le complexe ML est déjà discutée au paragraphe 3.3.3. L'augmentation de la stabilité du complexe ternaire MLX est due aux mêmes raisons que celles de ML, et vaut environ 4.8 kJ/mole (environ 6 kJ/mole pour ML). Le fait que cette stabilisation soit inférieure à celle du complexe binaire provient de l'augmentation de l'énergie du champ de ligands du plan qui provoque un affaiblissement des liaisons de coordinations axiales (deux molécules d'eau sont remplacées, dans le plan, par l'acide aminé) ⁽³⁰⁾. Ainsi, l'abondance du complexe ternaire MLX passe d'environ 10 % (systèmes à ligand linéaire) à 30 - 45 % suivant l'acide aminé (systèmes à ligand ramifié, cf. plus loin la figure 21).

Quant au complexe ternaire $M(H_{-1}L)X$, les valeurs $\log \beta_{1-111}$ des systèmes à ligand ramifié et linéaire sont du même ordre de grandeur (tableaux 5 et 8). La discussion relative au complexe $M(H_{-1}L)$ dans le paragraphe 3.3.3 reste valable ici. La présence d'un reste β -carboxylate en position 1 du tripeptide affecte que peu la stabilité (et l'abondance) du complexe ternaire $M(H_{-1}L)X$. Elle pourrait même, semble-t-il, le déstabiliser légèrement, comme dans le cas du complexe binaire $M(H_{-2}L)$. Comme le bras β -carboxylate est coordonné, du moins partiellement, dans le complexe $M(H_{-2}L)$, il l'est certainement également dans le complexe ternaire $M(H_{-1}L)X$, et cela d'autant mieux que l'énergie du champ de ligands du plan est plus petite (une dent N-peptide est remplacée par celle de N-amino).

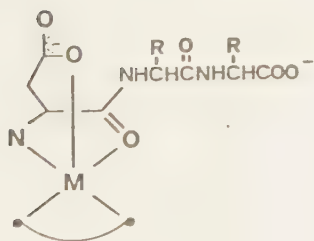
4.4 Conclusions

Lorsqu'un système cuivre(II)-tripeptide est perturbé par la présence d'un acide aminé, les espèces principales $M(H_{-2}L)$ et $M(H_{-1}L)$ en milieu basique et neutre sont remplacées par les complexes ternaires.

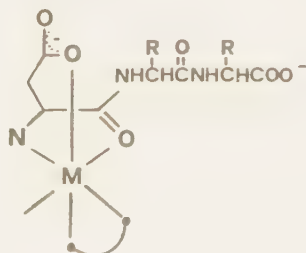
Le complexe MLX, qui apparaît à des pH compris entre 5 et 9, est nettement stabilisé par la coordination du reste β -carboxylate. La formation du complexe $M(H_1L)X$, qui existe en milieu basique, entre en compétition surtout avec $M(H_2L)$. Suivant l'acide aminé (par exemple Ser), elle est même nettement favorisée.

Des structures peuvent être proposées (figures 20A et B).

La comparaison des propriétés thermodynamiques de l'espèce MLX avec des ligands ramifiés ou non montre que le reste β -carboxylate est coordonné. Les connaissances en chimie du cuivre(II) permettent de proposer la structure I comme étant plus probable que I', car elle possède deux cycles de chélation à 5 membres dans le plan. Les isomères cis et trans existent certainement en solution (figure 20A).



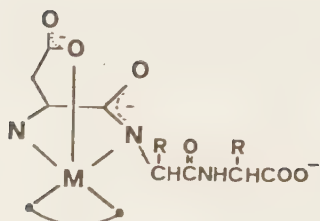
I (cis et/ou trans)



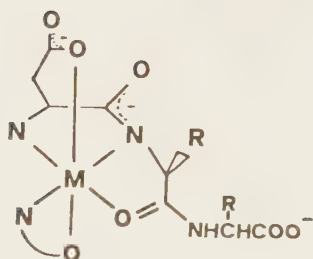
I'

Figure 20A : structures possibles de MLX

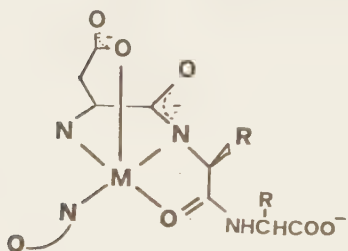
La structure préférentielle de $M(H_1L)X$ est II (figure 20B). L'ordre de grandeur de $K_{M(H_1L)}^{M(H_1L)X}$ est typique pour un acide aminé



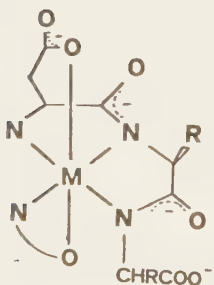
II : $M(H-L)X$ (cis et/ou trans)



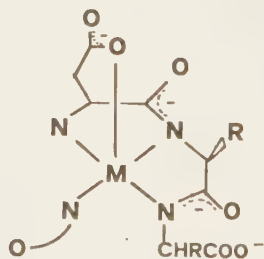
II'



II''



III : $M(H_2-L)X$



III'

Figure 20B : structures possibles des complexes ternaires
(la coordination du reste β -carboxylate est certainement partielle)

bidenté (donc pas II''). Les propriétés spectroscopiques ne permettent pas de choisir entre II et II'. Cependant un cycle à 5 membres ($M \text{---} X$) avec une position axiale du complexe demeure peu favorable ⁽²³⁾. La structure II' sera d'ailleurs éliminée plus bas (chapitre 5).

L'ordre de grandeur des constantes de formation de l'espèce $M(H_{-2}L)X$ ($\ll$ celles de $M(H_{-1}L)X$) peut indiquer que l'acide aminé est monodenté (structure III') ou chélaté dans un cycle peu favorable avec une position axiale (structure III). En raison de l'incertitude relative à cette espèce (calculs de $\log \beta_{1-211}$ et des spectres peu fiables) et de son existence à des pH trop élevés, les propriétés de cette espèce ne seront plus approfondies.

5 RÔLE DU SUBSTITUANT 2 DU TRIPEPTIDE

=====

5.1 Introduction

Dans ce chapitre, le rôle du substituant 2 du tripeptide dans la formation des complexes ternaires est étudié. Nous utiliserons les peptides AspGlyGly, AspAlaGly, et AspGlyAla, et les acides aminés Ala, Pro, Arg, Ser, et Lys. Certains effets ayant déjà été observés avec un encombrement stérique minimum ($R = -CH_3$) (21,22,27), nous supposons que l'effet stérique d'un tel reste soit significatif relativement aux propriétés thermodynamiques et structurales de nos complexes ternaires.

5.2 Phénoménologie

5.2.1 Constantes de formation et distributions des espèces

Nous avons calculé les constantes de formation des complexes ternaires à partir des mesures de courbes de titrage dont les conditions sont indiquées dans le tableau 7.

Les constantes $\log \beta_{mh10}$ sont celles du tableau 2, tandis que les valeurs $\log \beta_{mh0x}$ proviennent d'une table (40). Les constantes $\log \beta_{1h11}$ sont calculées par le programme SCOGS modifié (32,34). Le tableau 8 indique le résultat des calculs : $\log \beta_{1h11}$ et les déviations standards (s) des valeurs $\log \beta$ ainsi que les constantes calculées $K_{M(H_hL)}^{M(H_hL)_x} = \log \beta_{1h11} - \log \beta_{1h10}$.

Les distributions de toutes les espèces $M(H_hL_1)_x$ sont dessinées sur les figures 21.1-5, pour des concentrations $C_M = C_L = C_X = 5 \text{ mM}$ ($\mu = 0.1 \text{ M KNO}_3$, $T = 25^\circ$).

L	X	C _M (mM)	C _L (mM)	C _X (mM)	méthode (*)
AspGlyGly	Ala	7.32	7.18	7.32	a
		6.10	6.10	6.10	c
		6.09	6.09	6.09	b
	Pro	6.10	6.10	6.10	c
		6.09	6.09	6.09	b
		6.10	6.10	6.10	c
	Arg	7.32	7.25	7.32	a
		6.10	6.10	6.10	c
		6.09	6.09	6.09	b
	Ser	6.10	6.10	6.10	c
		6.10	6.10	6.10	c
AspAlaGly	Ala	7.32	7.14	7.32	a
		6.10	6.10	6.10	c
		6.10	6.10	6.10	c
	Pro	6.10	6.10	6.10	c
		6.10	6.10	6.10	c
	Arg	7.32	7.18	7.32	a
		6.10	6.10	6.10	c
	Ser	6.10	6.10	6.10	c
		6.10	6.10	6.10	c
	Lys	6.10	6.10	6.10	c
AspGlyAla	Ala	7.32	7.18	7.32	a
	Pro	6.10	6.10	6.10	c
	Arg	6.10	6.10	6.10	c
		7.32	7.18	7.32	a
	Ser	6.10	6.10	6.10	c
		7.32	7.18	7.32	a
	Lys	6.10	6.10	6.10	c
		6.10	6.10	6.10	c

Tableau 7

(*) cf. 8.1.1

L	X	$\log \beta_{1011}$ (s)	$\log K$	$\log \beta_{1-111}$ (s)	$\log K$	$\log \beta_{1-211}$ (s)	$\log K$
AspGlyGly	Ala	13.25 (.02)	7.07	5.65 (.02)	5.77	-5.54 (.08)	1.75
	Pro	13.73 (.04)	7.55	6.30 (.04)	6.42	-4.87 (.06)	2.42
	Arg	12.89 (.03)	6.71	5.56 (.02)	5.68	-5.43 (.07)	1.86
	Ser	13.02 (.03)	6.84	5.58 (.03)	5.70	-4.56 (.04)	2.73
	Lys	12.92 (.02)	6.74	5.53 (.02)	5.65	-4.57 (.03)	2.72
AspAlaGly	Ala	13.25 (.02)	7.02	4.94 (.07)	4.89	-5.39 (.09)	1.37
	Pro	13.61 (.03)	7.38	-	-	-5.27 (.07)	1.49
	Arg	12.93 (.02)	6.70	-	-	-4.83 (.04)	1.93
	Ser	12.97 (.02)	6.74	4.19 (.23)	4.14	-4.78 (.04)	1.98
	Lys	12.85 (.01)	6.62	4.62 (.05)	4.57	-5.23 (.09)	1.53
AspGlyAla	Ala	13.23 (.03)	6.99	5.62 (.03)	5.57	-5.59 (.12)	1.47
	Pro	13.75 (.04)	7.51	6.27 (.04)	6.22	-4.68 (.04)	2.38
	Arg	12.88 (.03)	6.64	5.59 (.03)	5.54	-5.29 (.08)	1.77
	Ser	13.01 (.02)	6.77	5.36 (.03)	5.31	-5.09 (.05)	1.97
	Lys	12.96 (.02)	6.72	5.54 (.02)	5.49	-4.43 (.03)	2.63

Tableau 8 ($\log K = \log \beta_{1h11} - \log \beta_{1h10}$) $\mu = 0.1 \text{ M KNO}_3$, $T = 25^\circ$

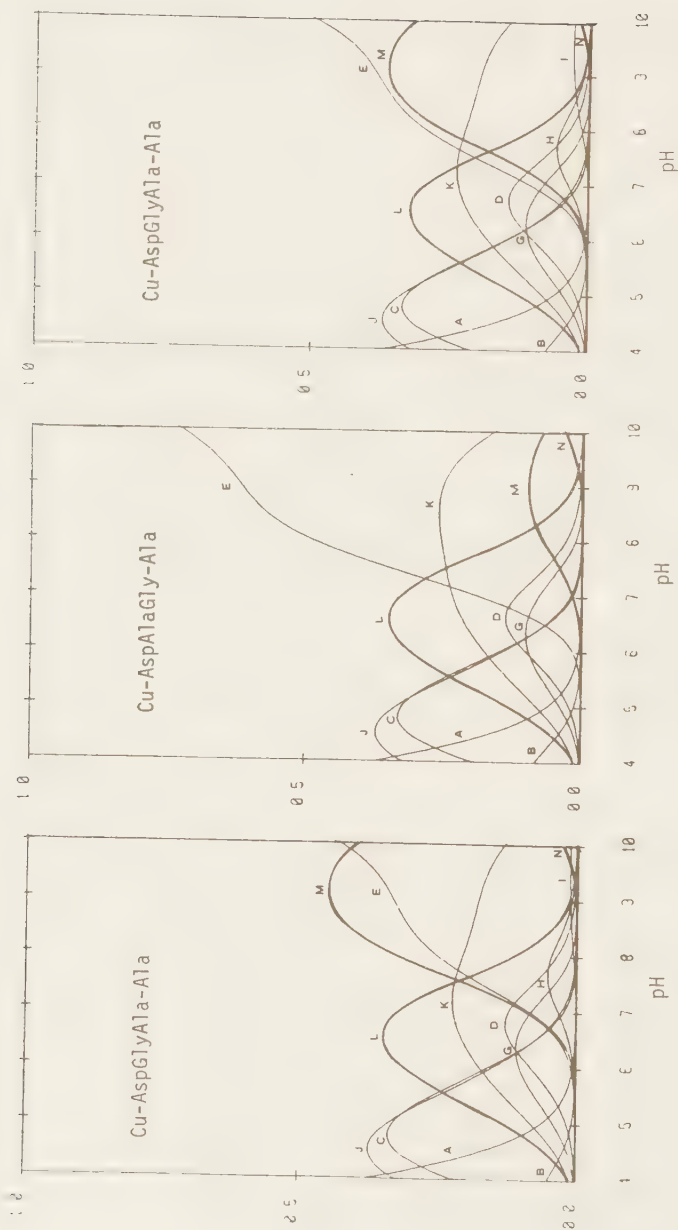


Figure 21.1 A Cu^{2+} , B $\text{M}(\text{HL})$, C ML , D $\text{M}(\text{H}_2\text{L})$, E $\text{M}(\text{H}_2\text{L})$, F $\text{M}(\text{H}_2\text{L})\text{OH}$, G ML_2 , H $\text{M}(\text{H}_2\text{L})\text{L}$, I $\text{M}(\text{H}_2\text{L})_2$
 J MX , K MX_2 , trait renforcé: L MLX , M $\text{M}(\text{H}_2\text{L})\text{X}$, N $\text{M}(\text{H}_2\text{L})_2\text{X}$

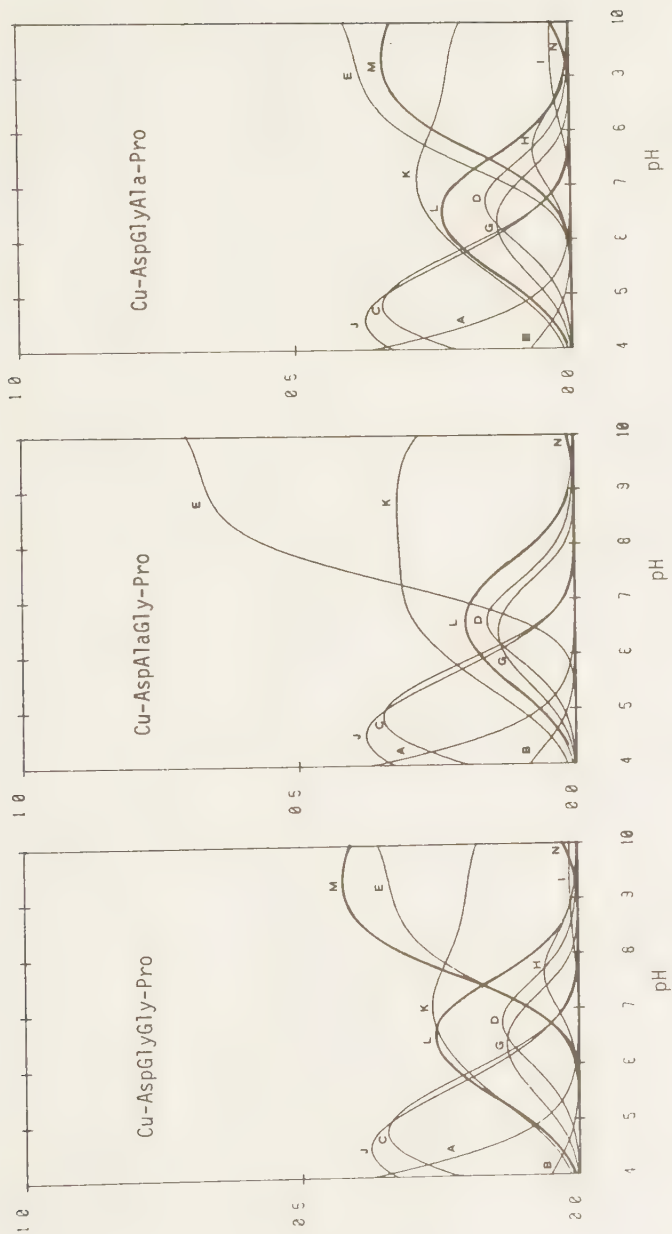


Figure 21.2 A Cu^{2+} , B $\text{M}(\text{HL})$, C ML , D $\text{M}(\text{H}_2\text{L})$, E $\text{M}(\text{H}_2\text{L})\text{OH}$, F $\text{M}(\text{H}_2\text{L})$, G ML_2 , H $\text{M}(\text{H}_2\text{L})\text{L}$, I $\text{M}(\text{H}_2\text{L})_2$
 J MX , K MX_2 , trait renforcé: L MLX , M $\text{M}(\text{H}_2\text{L})\text{X}$, N $\text{M}(\text{H}_2\text{L})\text{X}$

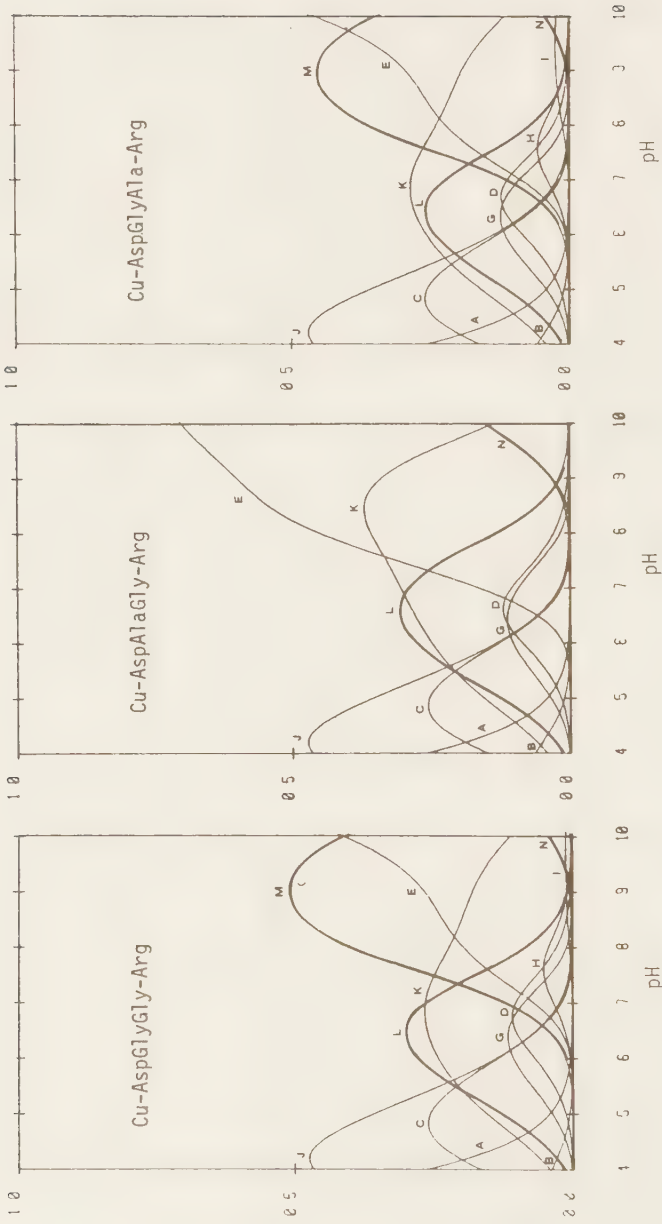


Figure 21.3 A Cu^{2+} , B $\text{M}(\text{HL})$, C ML , D $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})$, E $\text{M}(\text{H}_{-2}\text{L})$, F $\text{M}(\text{H}_{-2}\text{L})\text{OH}$, G ML_2 , H $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})\text{L}$, I $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})_2$
 J MX , K MX_2 , trait renforcé: L MLX , M $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})\text{X}$, N $\text{M}(\text{H}_{-2}\text{L})\text{X}$

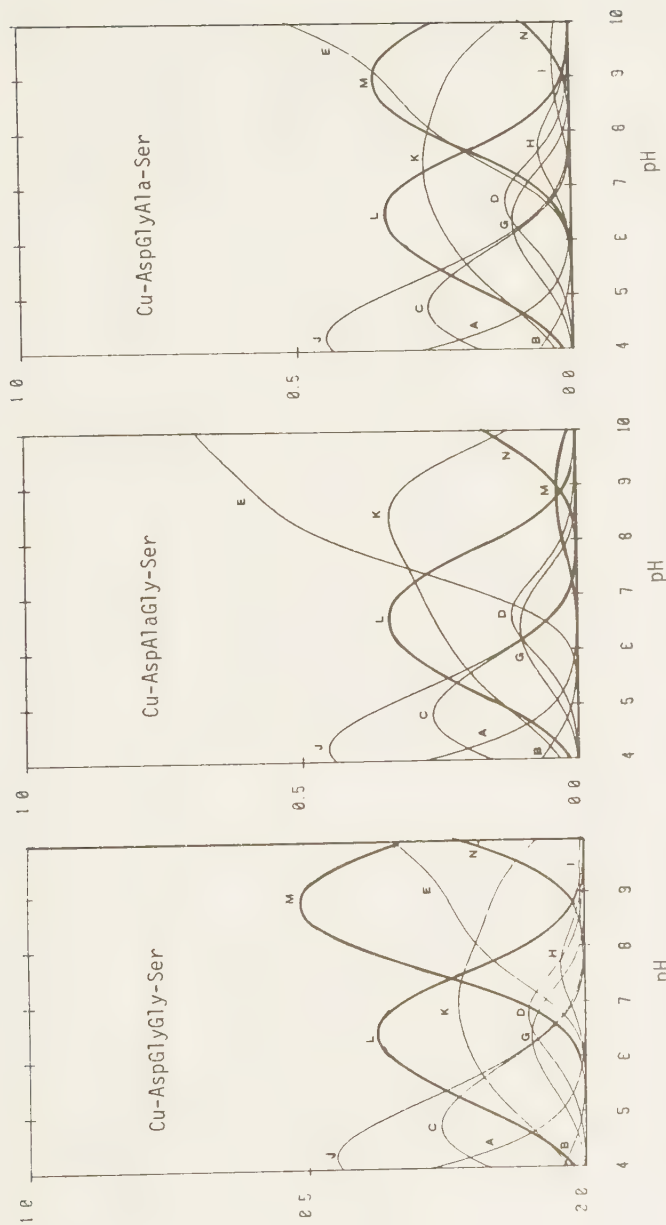


Figure 21.4 A Cu^{2+} , B $\text{M}(\text{HL})$, C ML , D $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})$, E $\text{M}(\text{H}_{-2}\text{L})$, F $\text{M}(\text{H}_{-2}\text{L})\text{OH}$, G ML_2 , H $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})$, I $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})_2$
 J MX , K MX_2 , trait renforcé: L MLX , M $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})\text{X}$, N $\text{M}(\text{H}_{-2}\text{L})\text{X}$

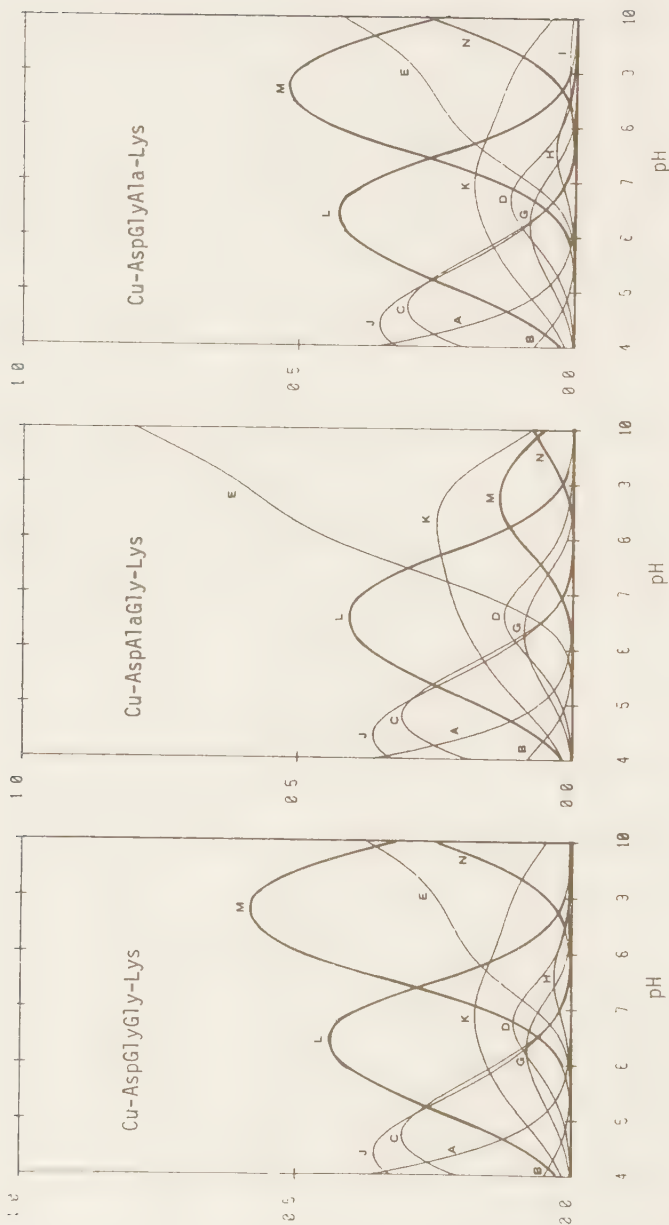


Figure 21.5 A Cu^{2+} , B $\text{M}(\text{HL})$, C ML , D $\text{M}(\text{H}_1\text{L})$, E $\text{M}(\text{H}_2\text{L})$, F $\text{M}(\text{H}_2\text{L})\text{OH}$, G ML_2 , H $\text{M}(\text{H}_1\text{L})\text{L}$, I $\text{M}(\text{H}_1\text{L})_2$
 J MX , K MX_2 , trait renforcé: L MLX , M $\text{M}(\text{H}_1\text{L})\text{X}$, N $\text{M}(\text{H}_2\text{L})\text{X}$

Les valeurs $\log \beta_{1011}$ se calculent facilement, l'abondance du complexe MLX étant dominante dans le mélange à des pH compris entre 5 et 8 (maximum d'abondance = 30-45 % vers pH = 6.5).

Les valeurs $\log \beta_{1-111}$ également se déterminent facilement, sauf avec le peptide AspAlaGly dont les propriétés particulières sont discutées plus bas. Pour les deux autres peptides, l'abondance de $M(H_1L)X$ est importante au-dessus de pH = 7.5, avec un maximum d'abondance d'environ 35 - 55 % vers pH = 9. A ce pH, et contrairement aux autres plus bas, les solutions contiennent un minimum d'espèces, spécialement $M(H_1L)X$, $M(H_2L)$ et MX_2 .

La détermination des constantes $\log \beta_{1-211}$ pose par contre certains problèmes, car la précision des mesures de pH est faible quand pH > 9 (calibrage du pHmètre difficile, rôle du Na^+) et que la pente des courbes de titrage est faible. L'abondance de ce complexe ternaire avec les acides aminés Ala et Pro reste faible (< 5 %) même à pH = 10, tandis que celle avec Ser et Lys atteint environ 20 % à pH = 10. Comme le complexe ternaire $M(H_2L)X$ sort de nos problèmes fondamentaux, et que sa détection est imprécise, nous ne commenterons que succinctement les propriétés de ce complexe.

Notons également que les constantes relatives aux acides aminés proviennent d'une table ⁽⁴⁰⁾ et qu'elles n'ont pas été modifiées (cette table, très critique, donne des valeurs très moyennes et sûres, sauf pour $Cu(Ser)_2$). Une telle utilisation de données constitue cependant une incertitude sur les calculs.

Dans les systèmes ternaires, l'abondance des biscomplexes est supérieure à celle observable dans les systèmes binaires, car le ion métallique se trouve en défaut. Cependant, les abondances maximales sont d'environ 10 - 15 % (vers pH = 6.2) de ML_2 , 3 - 6 % (vers pH = 7.7) de $M(H_1L)L$, et d'environ 1 - 3 % (vers pH = 10) de $M(H_1L)_2$.

Il peut être intéressant de calculer les constantes de formation des complexes ternaires par des considérations statistiques à partir des constantes des biscomplexes. Les écarts des constantes expérimentales à celles calculées pourraient indiquer des interactions entre les ligands (tripeptide et acide aminé) autour du ion métallique.

Les constantes de formation des complexes ternaires peuvent se calculer de la façon suivante ⁽²⁶⁾:

$$\log \beta_{111}^{\text{stat}} = \frac{1}{2} \log \beta_{1h20} + \frac{1}{2} \log \beta_{1h02} + \log S$$

Le facteur statistique S vaut 2 ($S = 2! / 1!1!$) pour des complexes MLX et $M(H_{-1}L)X$. Le tableau 9 donne les résultats des calculs de $\log \beta_{111}^{\text{stat}}$ ainsi que les écarts $\Delta_{111} = \log \beta_{111}^{\text{exp}} - \log \beta_{111}^{\text{stat}}$.

D'après ces calculs statistiques, la majorité des complexes ternaires est favorisée. Les écarts Δ_{111} sont, cependant, les plus importants et tous positifs pour $M(H_{-1}L)X$, et c'est le complexe de la lysine qui s'écarte le plus de $\log \beta_{1-111}^{\text{stat}}$.

L'observation des figures 21.1-5 permet de constater une particularité importante du tripeptide AspAlaGly (reste méthyle en position 2): le complexe ternaire $M(H_{-1}L)X$ est fortement déstabilisé avec ce ligand, et sa formation est inhibée de façon importante suivant l'acide aminé.

La phénoménologie thermodynamique de cet effet peut être mise en évidence par le tableau 10 qui donne l'abondance des complexes ternaires MLX et $M(H_{-1}L)X$ lorsque le pH = 7.5. A ce pH physiologique, les abondances de ces deux complexes sont du même ordre de grandeur lorsque le deuxième acide aminé du tripeptide est la glycine.

X	$\log \beta_{1011}^{\text{stat}} \Delta_{1011}^{\text{AspGlyGly}}$	$\log \beta_{1011}^{\text{stat}} \Delta_{1011}^{\text{AspAlaGly}}$	$\log \beta_{1011}^{\text{stat}} \Delta_{1011}^{\text{AspGlyAla}}$
Ala	13.13	13.17	13.21
Pro	13.87	13.91	13.95
Arg	12.96	13.00	13.05
Ser	12.91	12.95	12.99
Lys	12.62	12.66	12.70
	$\log \beta_{1-111}^{\text{stat}} \Delta_{1-111}$		$\log \beta_{1-111}^{\text{stat}} \Delta_{1-111}$
Ala	4.98		5.24
Pro	5.72		5.98
Arg	4.80		5.07
Ser	4.76		5.02
Lys	4.47		4.73

Tableau 9

	M L X			M (H ₋₁ L) X		
	AspGlyGly	AspAlaGly	AspGlyAla	AspGlyGly	AspAlaGly	AspGlyAla
Ala	24	25	21	20	4	17
Pro	17	15	16	21	0	16
Arg	18	23	16	27	0	23
Ser	23	26	22	27	2	18
Lys	27	30	26	31	6	28

Tableau 10 : abondance (%) de MLX et M(H₋₁L)X lorsque pH = 7.5

5.2.2 Phénoménologie spectrochimique

Il est possible de confirmer la phénoménologie thermodynamique par des observations spectroscopiques.

Lors des titrages des solutions ternaires, les solutions comprenant le peptide AspAlaGly se différencient nettement de celles comprenant AspGlyGly ou AspGlyAla par une couleur plus bleue et plus intense. Après addition de quatre équivalents de base, les spectres VIS des solutions sont représentés dans la figure 22.

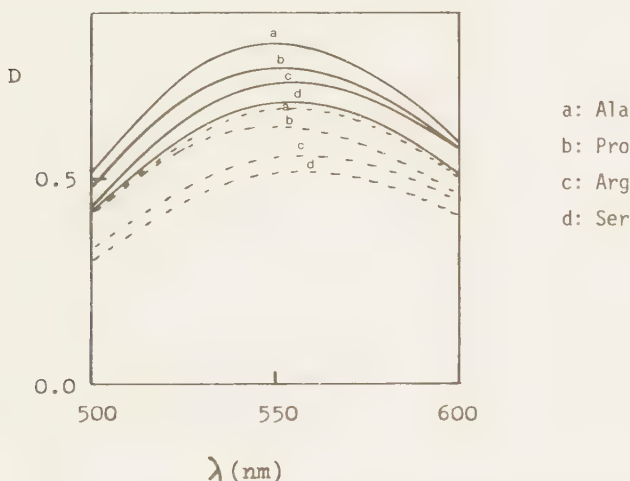


Figure 22 : spectres VIS des solutions contenant Cu^{2+} -tripeptide-acide aminé 1:1:1 ($C = 6.1 \text{ mM}$, $\mu = 0.1 \text{ M KNO}_3$, $T=25^\circ$)
 $L = \text{AspAlaGly}$ (—), AspGlyAla (----

Une autre façon de mettre en évidence le rôle d'un reste méthyle en position 2 du tripeptide consiste à titrer une solution qui contient initialement $\text{M}(\text{H}_2\text{L})$ par HX et de mesurer les spectres VIS et CD. Les figures 23 et 24 montrent l'évolution de la densité

optique et de l'ellipticité d'une solution de complexe $M(H_2L)$, (L = AspAlaGly et AspGlyAla) titrée par une solution de (R)Pro.

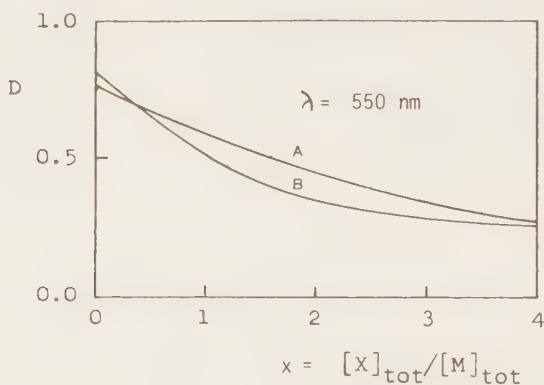


Figure 23 : densité optique d'une solution de $M(H_2L)$ (5 mM) lors du titrage par (R)Pro. A L=AspAlaGly, B L=AspGlyAla

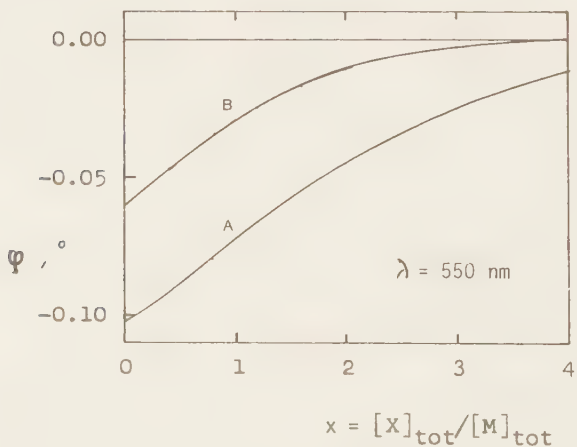


Figure 24 : ellipticité d'une solution de $M(H_2L)$ (5 mM) lors du titrage par (R)Pro. A L=AspAlaGly, B L=AspGlyAla

Les mesures sont faites à $\lambda = 550$ nm. A cette longueur d'onde, le pouvoir rotatoire des complexes de la proline est proche de zéro, si bien que la densité optique est due essentiellement à $M(H_{-2}L)$, $M(H_{-1}L)X$ et MX_2 , et l'ellipticité surtout à $M(H_{-2}L)$ et $M(H_{-1}L)X$ (avec peu de contribution rotatoire de X). Les mesures potentiométriques permettent d'interpréter qualitativement les particularités spectroscopiques dues à un reste méthyle en position 2 du tripeptide.

De façon générale, l'abondance des complexes $M(H_{-1}AspAlaGly)X$ est faible, voire nulle suivant X. Ainsi, une variation de C_X permet de différencier fortement les systèmes qui comprennent le tripeptide AspAlaGly. La figure 25 montre les changements des concentrations des complexes principaux calculées à pH = 8.5.

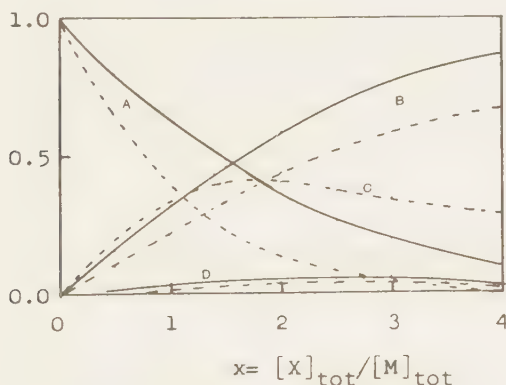


Figure 25 : influence de la concentration totale en proline

($C_M = C_L = 5$ mM, pH = 8.5).

L = AspAlaGly (—), L = AspGlyAla (-----)

A $M(H_{-2}L)$, B MX_2 , C $M(H_{-1}L)X$, D MLX

Cette figure permet d'interpréter les courbes des figures 23 et 24 au moins qualitativement.

Comme les propriétés spectroscopiques (ϵ et $\Delta\epsilon$) du complexe $M(H_{-2}L)$ sont nettement supérieures à celles des autres espèces (cf. chapitre 6), les propriétés géométriques des courbes A, fig. 25 ressemblent à celles des figures 23 et 24. Les courbes B, fig. 23 et 24 (où $L = AspGlyAla$) s'incurvent lorsque $x = 1.5 - 2$. Cela est dû au maximum de l'abondance de $M(H_{-1}L)X$. Par contre, les courbes des lignes A, fig. 23 et 24 (où $L = AspAlaGly$) sont moins prononcées et plus régulières, car le système contient essentiellement deux complexes, $M(H_{-2}L)$ et MX_2 (courbes A et B, fig. 25) dont les variations de concentration ne montrent pas de singularités.

5.3 Interprétation stérique

Le complexe ternaire MLX n'est pas affecté par un reste méthyle en position 2 du tripeptide du moins en ce qui concerne les constantes de formation $\log \beta_{1011}$ et $\log K_{ML}^{MLX}$ (tableau 8). La structure I, figure 20 ne permettrait pas, du reste, d'expliquer un effet éventuel.

L'effet stéréochimique le plus important de ce travail concerne le rôle du substituant en position 2 du tripeptide sur la formation du complexe ternaire $M(H_{-1}L)X$, comme le montrent les figures 21. 1-5 et le tableau 10.

La déstabilisation du complexe peut tout d'abord s'expliquer simplement par un effet stérique statique. La figure 26 montre un modèle à calottes du complexe $M(H_{-1}AspAlaGly)$. Dans nos systèmes, la constante de formation $\log K_{M(H_{-1}L)}^{M(H_{-1}L)X}$ doit être supérieure à 4.5 pour que l'abondance de $M(H_{-1}L)X$ soit détectable. Un tel ordre de grandeur suggère que l'acide aminé est chélaté ⁽³⁾. Les complexes $M(H_{-2}L)X$, où X est certainement monodenté (structure III, figure 20), ont une constante $\log \beta_{1-211}$ inférieure de 3 - 4 ordres de grandeur à celle des complexes $M(H_{-1}L)X$, où X est

certainement bidenté (structure II, figure 20). Hors, le modèle I (figure 26) montre que l'une des positions du plan peut être masquée par le reste en position 2 du tripeptide, si bien que l'acide aminé ne peut plus chélater les deux positions du plan. D'autres rotamères peuvent en principe exister (II - VI, figure 26). Mais seuls les rotamères I, II, et VI ont une position de coordination masquée partiellement par le reste méthyle en position 2. Les modèles I et I' permettent de visualiser la différence d'occupation de l'espace par un reste méthyle ou hydrogène. Mais les observations expérimentales ainsi que cette explication stérique montrent, que pour le complexe ternaire, la conformation de la partie peptidique non coordonnée doit donc approcher la structure I, figure 26.

L'acide aminé n'est donc pas chélaté avec une position axiale (structure II', figure 20).

Cette explication stérique permet également de comprendre pourquoi les complexes $M(H_1L)X$ de dipeptides peuvent exister ⁽¹¹⁾. Dans ce type de systèmes, la partie non coordonnée du dipeptide est beaucoup plus petite et polaire que celle d'un tripeptide, si bien que les rotamères IV et V peuvent être stabilisés dans un milieu polaire.

Une autre approche d'explication du phénomène d'inhibition stérique consiste à envisager l'équilibre



dynamiquement, c'est-à-dire que du point de vue moléculaire, des complexes ternaires et binaires se forment continuellement. Un travail sur la cinétique de la réaction de $HX = en$, trien, HEDTA, avec le complexe $M(H_2L)$ a montré que la réaction débute par la substitution de la fonction carboxylate terminale par l'amine attaquante ⁽²¹⁾. Cette étape est suivie par le clivage $M-N$ -peptide et la chélation du ligand bidenté. Il est ainsi clair que l'espace non atteint par le reste peptidique non coordonné dépend



Figure 26 : Rotamères du complexe $M(H_2L)$ (en présence de X dans le système)

I - VI : L = AspAlaGly

I' : L = AspGlyGly



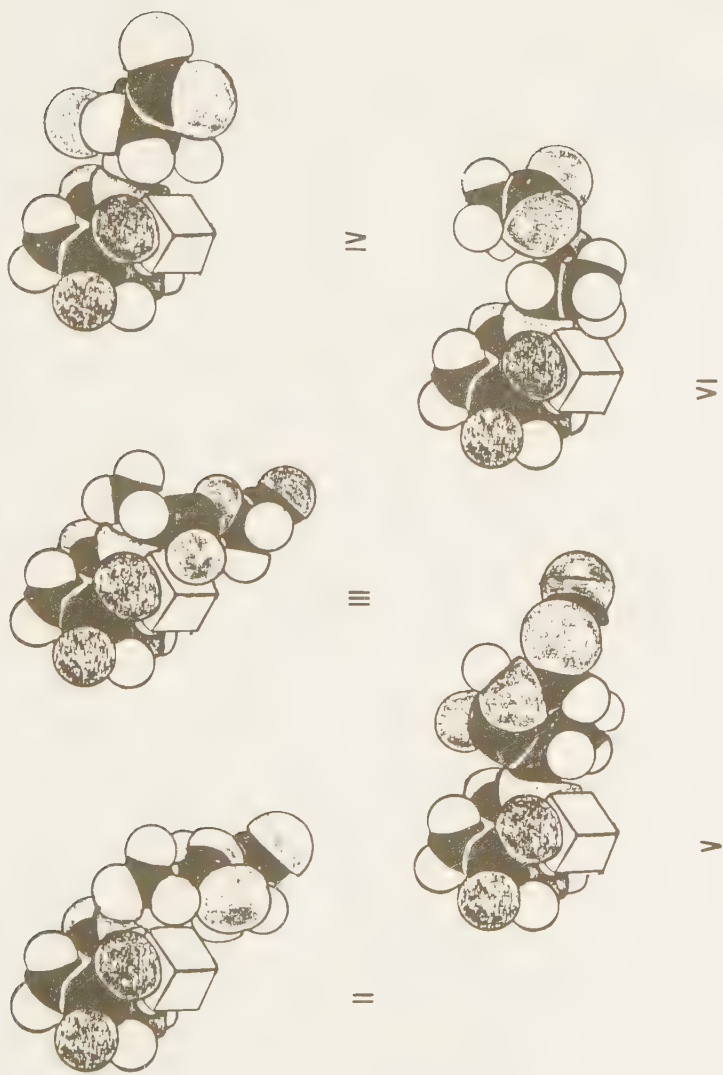


Figure 26 : Rotamères du complexe $M(H_{-1}AspAlaGly)$ (en présence de X dans le système)

beaucoup du reste en position 2 du tripeptide. La figure 27 montre quelques rotamères qui permettent d'évaluer la diminution de l'espace due à un reste méthyle en position 2 du peptide.

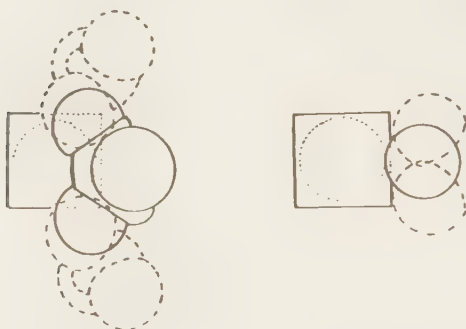


Figure 27 : Evaluation de l'occupation supplémentaire de l'espace engendrée par un reste méthyle en position 2 .
Rotation de la liaison MN^--CHR ($R = CH_3$ et H)
(Le cercle pointillé indique l'occupation du site par un oxygène de l'acide aminé)

Cette diminution peut s'estimer à environ 50 %. Lorsque HX réagit avec $M(H_2L)$, le proton peut être transféré sur l'azote qui devient asymétrique (21). De par la présence du reste méthyle au-dessus du plan, il est alors possible que le reste non coordonné du peptide se place au-dessous du plan (figure 28 I), ce qui, après clivage de la liaison $M-N$ -peptide, amène automatiquement le reste méthyle au voisinage de la position du plan (figure 28 II). La figure 29 montre les modèles à calottes qui correspondent aux structures I et II, figure 28. On y voit clairement l'impossibilité de la chélation de l'acide aminé lorsque $L = AspAlaGly$,

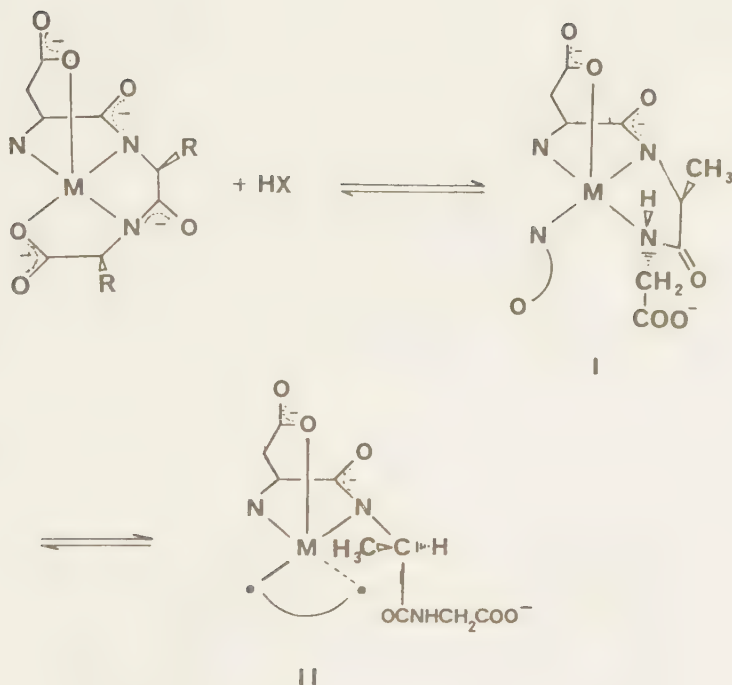
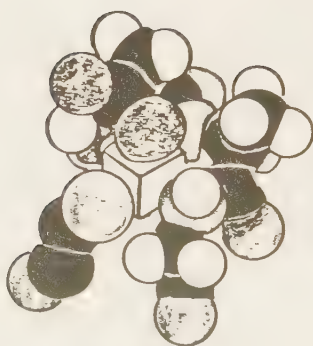


Figure 23 : mécanisme possible expliquant l'inhibition de la formation de $M(H_1AspAlaGly)X$

contrairement au cas où $L = AspGlyGly$ (figure 29 III).

Le mécanisme permet immédiatement de voir les différences entre les complexes de tripeptide et de dipeptide: pas de protonation d'un $N^{+}pep.$, et la séquence $-CONHCHRCOO^-$ est remplacée par COO^- . Aucun effet stérique n'est donc possible.

Dans un tel mécanisme, le reste de l'acide aminé joue également un rôle important. Premièrement, il modifie l'acidité des fonctions ammonium et acide carboxylique (par exemple, relativement aux pK_{a2}



I



II



III

Figure 29

I : intermédiaire avec azote protonné

II : chélation de X inhibée ($R = CH_3$)

III : " de X possible ($R = H$)

(seuls les atomes C,N et O de X sont représentés)

Pro > Ala > Arg $\approx$ Ser $\approx$ Lys) et les constantes de formation des complexes (par exemple relativement à β_2 : Pro > Ala > Arg $\approx$ Ser > Lys). D'autre part, il différencie les acides aminés relativement à l'inhibition de la formation du complexe $M(H_{-1}L)X$. Le classement des acides aminés relativement à cet effet : Arg > Pro > Ser > Lys > Ala correspond à celui de la grandeur des restes des acides aminés à l'exception de Lys. Le mécanisme de la figure 28 explique ce comportement: lors de la formation de l'intermédiaire (coordination monodentée de l'acide aminé) puis de la chélation de X, ce dernier doit interagir avec le troisième acide aminé du peptide.

5.4 Conclusions

La nature du deuxième acide aminé du tripeptide joue un rôle primordial dans les systèmes ternaires. Un reste méthyle en position 2 défavorise drastiquement la formation du complexe ternaire $M(H_{-1}L)X$ et non celle de MLX et de $M(H_{-2}L)X$.

Un mécanisme permet d'expliquer cet effet important. Il n'est explicable que si l'acide aminé dans le complexe $M(H_{-1}L)X$ est bidenté et coordonné dans le plan Cu-peptide (structure II, figure 20).

L'hypothèse que l'acide aminé est bidenté dans les complexes MLX et $M(H_{-1}L)X$ et monodenté dans $M(H_{-2}L)X$ est supportée par l'effet d'inhibition stérique et le mécanisme de formation du complexe $M(H_{-1}L)X$, ainsi que par la comparaison des ordres de grandeur des constantes $K_{M(H_{-1}L)}^{M(H_{-1}L)X}$.

La nature de l'acide aminé joue également un rôle important. L'effet d'inhibition stérique sur la formation de $M(H_{-1}L)X$ augmente avec la grandeur du reste de l'acide aminé, sauf s'il est coordonnable (Lys).

L'écart des constantes de formation des complexes ternaires par rapport aux prédictions statistiques dépend passablement de X. Cet effet pour $M(H_1L)X$ est positif et significatif (maximum avec Lys : $\Delta_{1-111} \approx +1$ unité log.). Relativement au complexe MLX, il est négatif (~ -0.1 unité log avec Pro et Arg) ou positif (maximum avec Lys $\approx +0.3$ unité log.). La relation $\Delta_{1-111} > \Delta_{1011}$ montre que les interactions attractives entre les ligands sont plus grandes lors du mécanisme de la formation de $M(H_1L)X$ que de MLX, et qu'elles font intervenir également la partie non coordonnée du ligand peptidique.

6 DIASTERESELECTIVITE DANS LA FORMATION DES =====

COMPLEXES TERNAIRES =====

6.1 Introduction

Une étude de la diastéréosélectivité peut surprendre dans le cadre de la phénoménologie des systèmes naturels. En effet, les problèmes liés au transport du cuivre(II) fait intervenir des acides aminés de configuration S. De plus, la compréhension des propriétés thermodynamiques de nos systèmes ne fait pas intervenir la configuration de l'acide aminé et pas l'isomérisie cis/trans des complexes ternaires.

Le but de cette étude n'est pas de rechercher le meilleur système diastéréosélectif (des effets peu importants sont prévisibles pour des structures essentiellement planes). Par contre, nous envisageons cette étude comme une méthode analytique.

Cette méthode permet d'aborder des aspects liés aux questions discutées aux chapitres 3 - 5. Les questions liées à la stéréochimie sont les suivantes :

- en quoi les propriétés thermodynamiques (tableau 8, figures 21. 1 - 5) des complexes ternaires diastéréoisomères sont-elles fonction de la configuration de l'acide aminé ?
- les propriétés thermodynamiques sont-elles compatibles avec la relation entre les écarts Δ_{1h11} et les interactions entre les ligands (tableau 9) ?
- les structures des complexes ternaires (figure 20) peuvent-elles être précisées par rapport aux isomères cis et trans ?
- un mécanisme analogue à celui de la formation de $M(H_{-1}L)X$ (figure 28) peut-il être appliqué au complexe MLX ?

Nous envisageons la diastéréosélectivité dans les réactions suivantes :

I: Cu-tripeptide + (S)X $\rightleftharpoons$ Cu-tripeptide-(S)X (cis et/ou trans)

II: Cu-tripeptide + (R)X $\rightleftharpoons$ Cu-tripeptide-(R)X (cis et/ou trans)

Les constantes d'équilibre relatives aux équations I et II sont déterminées par des mesures potentiométriques. Cette méthode n'informe pas sur la structure des complexes (isomérisie cis/trans), si bien que seule une diastéréosélectivité apparente peut être mesurée. Des mesures spectroscopiques (VIS, CD) permettent d'aborder les problèmes de l'isomérisie.

6.2 Phénoménologie thermodynamique

La détermination des constantes de formation de complexes ternaires par des mesures potentiométriques est très efficace et pratique. Mais quelle est la différence maximale de pH observable (cas de diastéréospécificité) ? Afin de répondre à cette question (dont la réponse n'est pas évidente pour nos systèmes), un exemple de diastéréospécificité peut être simulé.

Pour le système Cu^{2+} -AspGlyGly-Ala 1:1:1 pris comme exemple, le programme COMICS modifié⁽³⁴⁾ permet de calculer la concentration de chaque espèce (ligands et complexes) à différents pH dans 4 cas particuliers :

- absence des espèces MLX et $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})\text{X}$
- présence de MLX et absence de $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})\text{X}$
- absence de MLX et présence de $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})\text{X}$
- présence des espèces MLX et $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})\text{X}$

Il est ainsi possible de calculer la variation du pH due à la présence dans le système de 1 ou 2 complexes ternaires (figure 30).

La variation du pH due à la présence d'un complexe ternaire est négative avant le maximum d'abondance et positive après. Il est intéressant de constater que, au maximum d'abondance de chaque complexe ternaire pris séparément (courbes A et B, fig. 30), le complexe ternaire n'est responsable d'aucune variation de pH.

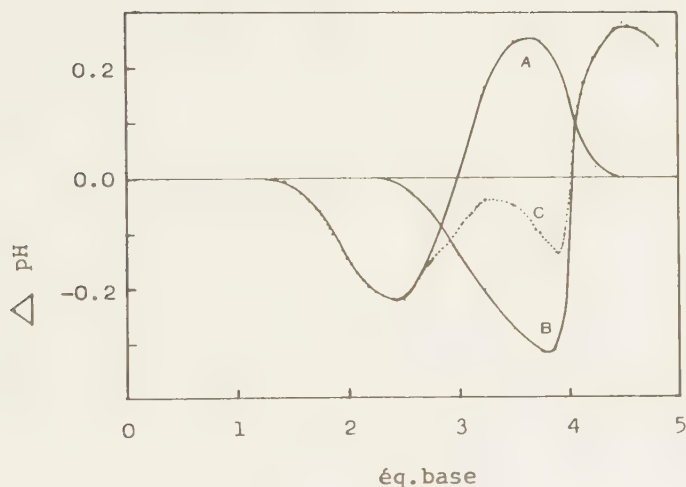


Figure 30 : simulation de la diastéréospécificité de la formation des complexes ternaires.

Variation de pH due à la présence de : A MLX, B $M(H_{-1}L)X$
C MLX et $M(H_{-1}L)X$

Dans notre système, la concentration de MLX est maximale à 3 équivalents de base ajoutés et celle de $M(H_{-1}L)X$ à 4 équivalents, si bien que les variations de pH se compensent presque entre 3 et 4 équivalents de base ajoutés (courbe C, fig. 30). Cette simulation de diastéréospécificité dans notre système montre également que les mesures de pH ne peuvent être différentes de plus de 0.3 unités pH environ.

Les titrages potentiométriques des systèmes contenant les acides aminés de configuration R ont été réalisés dans des conditions expérimentales identiques à celles indiquées dans le tableau 9. Dans le tableau 11 sont indiqués les valeurs calculées $\log \beta_{1h11}$, ainsi que les constantes $\log K$.

L	(R)X	$\log \beta_{1011}$ (s)	$\log K$	$\log \beta_{1-111}$ (s)	$\log K$	$\log \beta_{1-211}$ (s)	$\log K$
AspGlyGly	Ala	13.20 (.02)	7.02	5.65 (.02)	5.77	-5.54 (.07)	1.74
	Pro	13.94 (.03)	7.76	6.30 (.04)	6.42	-4.82 (.06)	2.47
	Arg	13.00 (.02)	6.82	5.63 (.02)	5.75	-5.09 (.04)	2.20
	Ser	13.04 (.03)	6.86	5.65 (.02)	5.77	-4.44 (.03)	2.85
	Lys	12.94 (.02)	6.76	5.50 (.02)	5.62	-4.58 (.04)	2.71
AspAlaGly	Ala	13.25 (.01)	7.02	4.93 (.06)	4.88	-5.41 (.08)	1.35
	Pro	13.96 (.03)	7.73	-	-	-4.90 (.06)	1.86
	Arg	13.01 (.02)	6.78	-	-	-4.82 (.03)	1.94
	Ser	13.01 (.02)	6.78	4.78 (.07)	4.73	-4.54 (.03)	2.22
	Lys	12.92 (.01)	6.69	4.56 (.06)	4.51	-5.24 (.09)	1.52
AspGlyAla	Ala	13.23 (.03)	6.99	5.64 (.03)	5.59	-5.81 (.17)	1.25
	Pro	13.98 (.04)	7.74	6.38 (.04)	6.33	-4.59 (.05)	2.47
	Arg	12.97 (.03)	6.73	5.49 (.03)	5.44	-5.23 (.08)	1.83
	Ser	13.00 (.03)	6.76	5.41 (.03)	5.36	-5.16 (.06)	2.58
	Lys	12.97 (.02)	6.73	5.53 (.02)	5.48	-4.48 (.03)	2.58

Tableau 11 $(\log K = \log \beta_{1h11} - \log \beta_{1h10})$ $\mu = 0.1 \text{ M KNO}_3, T = 25^\circ$

Les diastéréosélectivités apparentes $\chi_{R/S}$, définies comme étant le rapport des constantes $K_{M(H_hL)}^{M(H_hL)X}$ pour les acides aminés de configuration R et S, sont indiquées dans le tableau 12.

		AspGlyGly	AspAlaGly	AspGlyAla
$M_L X$	Ala	1.00	1.00	1.00
	Pro	1.62	2.24	1.70
	Arg	1.29	1.20	1.17
	Ser	1.05	1.10	0.98
	Lys	1.10	1.17	1.02
$M(H_{-1}L)X$	Ala	1.00	0.98	1.05
	Pro	1.00	-	1.29
	Arg	1.17	-	0.79
	Ser	1.17	-	1.12
	Lys	0.93	0.87	0.98

Tableau 12 : diastéréosélectivité apparente $\chi_{R/S}$

Ces diastéréosélectivités apparentes se manifestent dans les courbes de titrage par des différences de pH de quelques centièmes d'unité (environ 5 pour les plus grands écarts), ce qui est peu par rapport au ΔpH maximum qui serait observé dans le cas de diastéréospecificité.

Afin de concrétiser la signification des valeurs $\chi_{R/S}$ du tableau 12, les distributions des complexes ternaires dans tous les systèmes sont dessinées dans la figure 31.

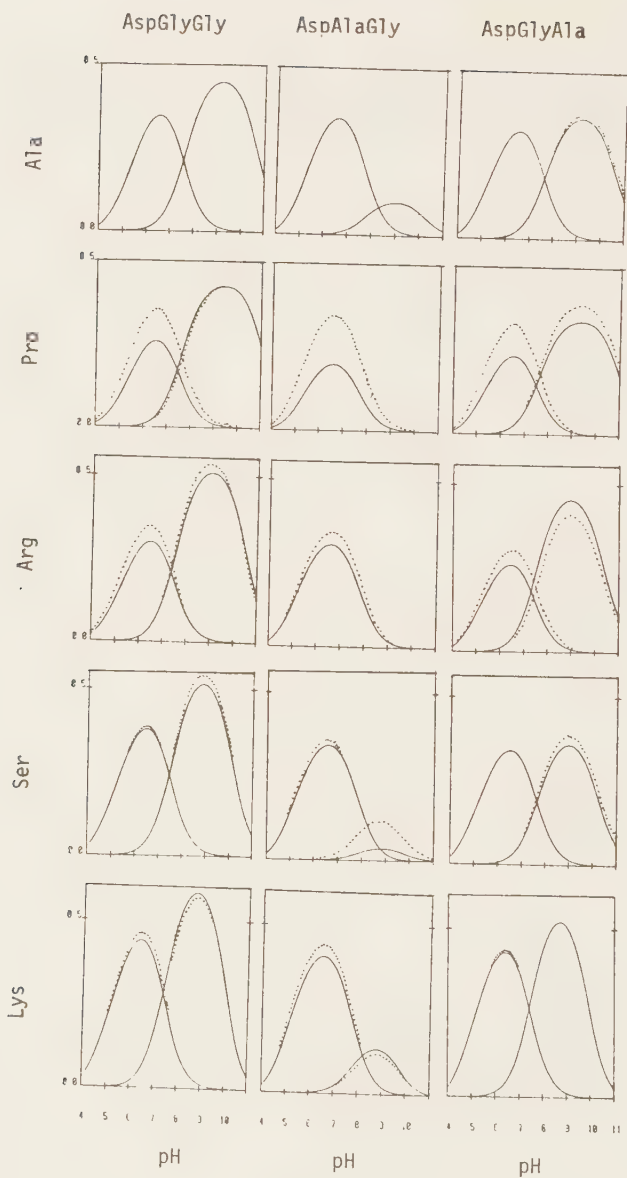


Figure 31 : distribution des complexes ternaires.
avec X de configuration S (—), R (.....)

6.3 Phénoménologie spectroscopique

Les différences, bien que petites, des constantes $\log |\beta_{1h11}|$ de systèmes contenant un acide aminé de configuration S ou R se manifestent nettement dans les spectres visibles des solutions après addition de 4 équivalents de base (3 avec Arg) (figure 32).

Les différences des spectres VIS proviennent non seulement des concentrations différentes de MX_2 , $M(H_2L)$ et $M(H_1L)X$, mais peut-être également d'un changement de la proportion des isomères cis et trans dont les spectres diffèrent certainement (61).

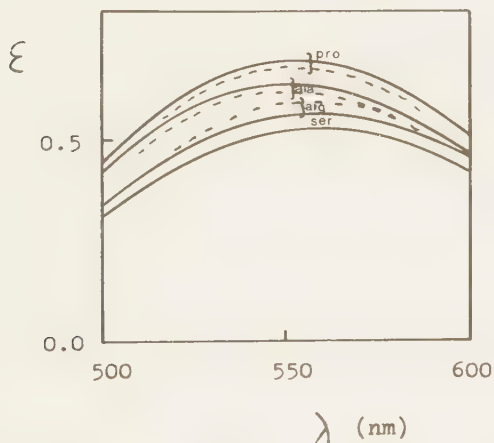


Figure 32 : spectres VIS des systèmes Cu-AspGlyAla-(S)X (—) et Cu-AspGlyAla-(R)X (----), après addition de 4 équivalents de base (Ala, Pro, Ser) ou 3 éq. (Arg).

Puisque les systèmes vers pH = 9 contiennent essentiellement trois espèces, il est possible de calculer les spectres VIS et CD des complexes $M(H_1L)X$, en utilisant les spectres des complexes MX_2

(figure 33) et $M(H_2L)$ (figures 10 et 11).

La figure 34 montre les spectres visibles calculés des complexes $M(H_1AspGlyAla)X$. Sur les figures 35 et 36 sont dessinés les spectres CD des complexes $M(H_1L)X$ (images A - E) ainsi que l'addition et la soustraction des spectres des diastéréoisomères (images A' - E').

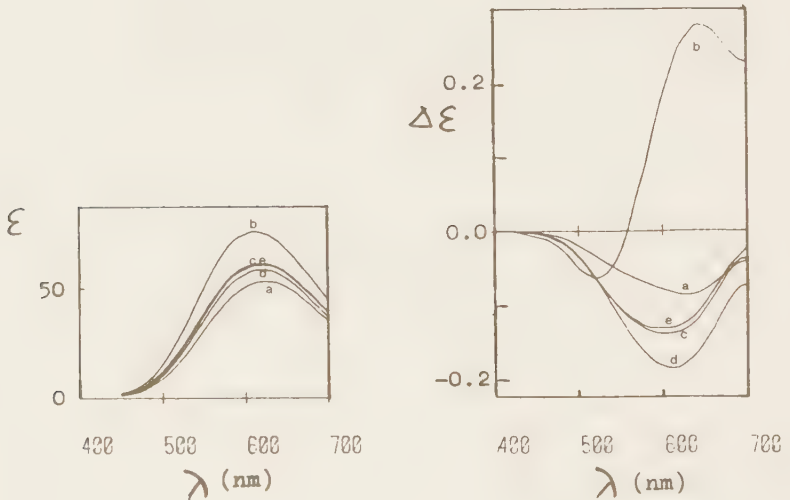


Figure 33 : spectres VIS et CD des complexes MX_2

X = : a Ala, b Pro, c Arg, d Ser, e Lys

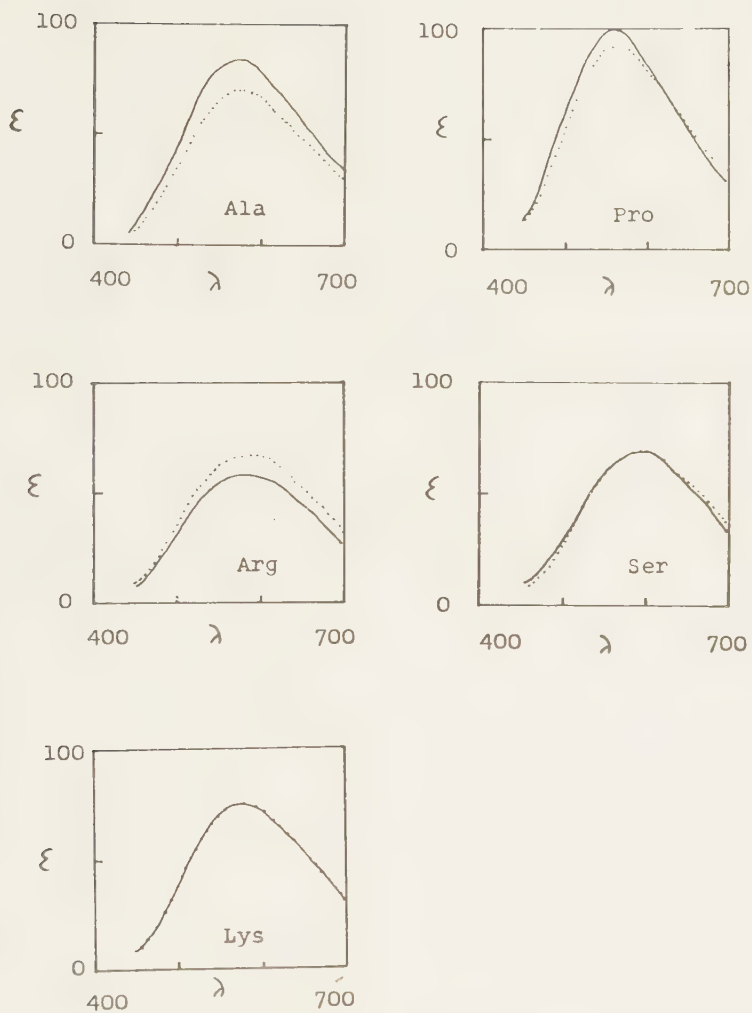


Figure 34 : spectres VIS calculés de $M(H_1\text{AspGlyAla})X$
(X de configuration : S (—), R (....))

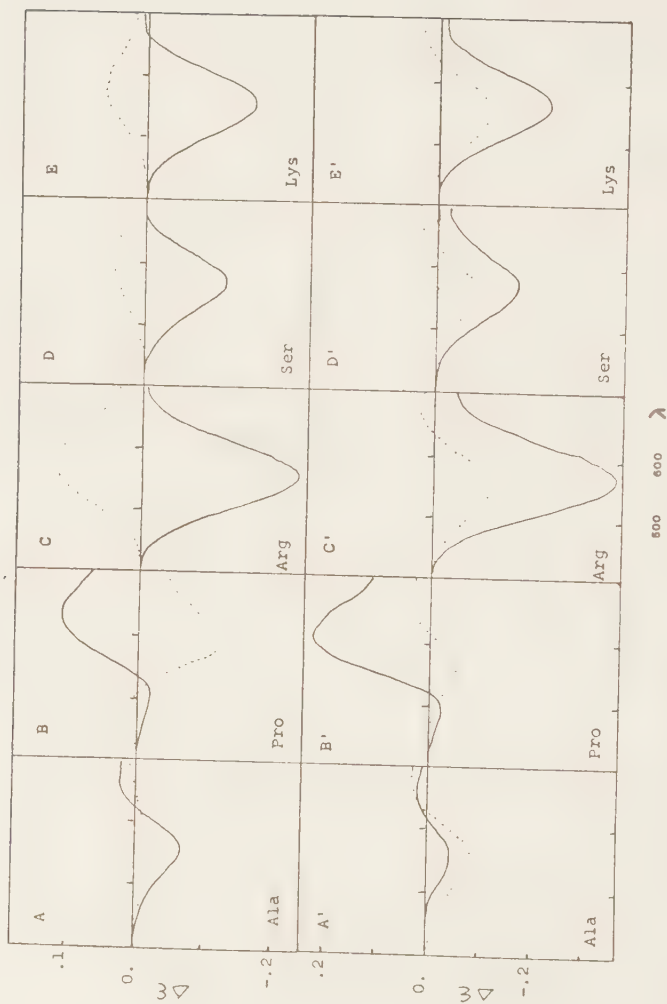


Figure 35 A - E :spectres CD calculés de $M(H_{1,1}AspGlyGly)X$. (X de configuration S (—), R (....))
A' - E' :addition des spectres CD des diastéréoisomères: (....)
" :soustraction des spectres CD (—) - (....) des figures A - E: (—)

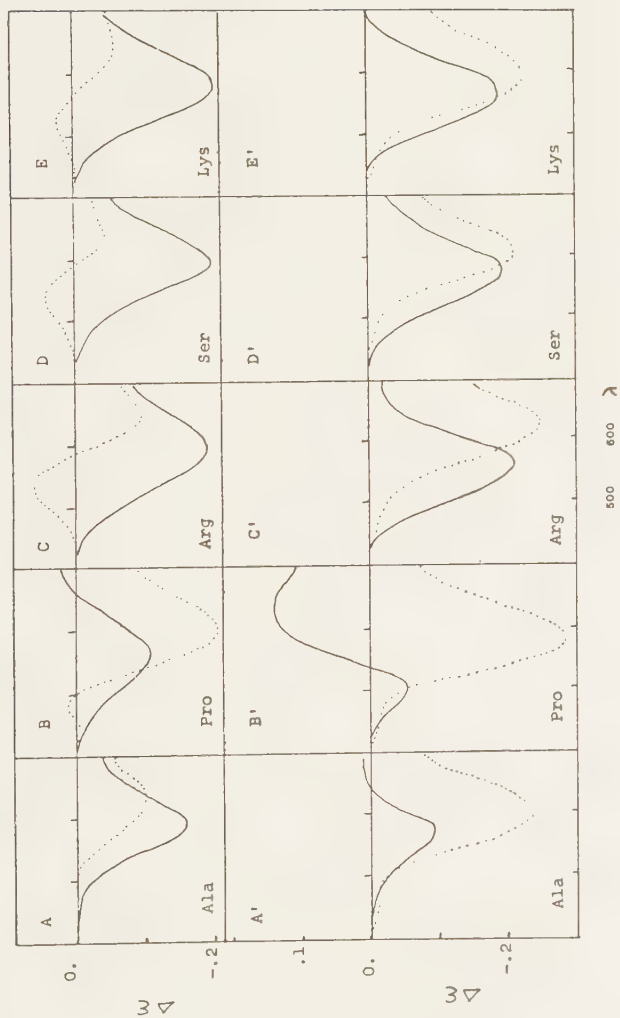


Figure 36 A - E: spectres CD calculés de $M(H_{11}AspGlyAla)X$. (X de configuration S (—), R (....))
A' - E': addition des spectres CD des diastéréoisomères : (....)
" : soustraction des spectres CD (—) - (....) des figures A - E : (—)

6.4 Diastéréosélectivité thermodynamique

Du tableau 12 et de la figure 31 il ressort que les complexes ternaires MLX et $M(H_{-1}L)X$ sont plus stables lorsque la configuration de l'acide aminé est R (à l'exception significative du complexe $M(H_{-1}AspGlyAla)Arg$).

Relativement aux complexes ternaires MLX, la plus grande diastéréosélectivité apparente s'observe pour le système Cu^{2+} -AspAlaGly-Pro. Dans ce système, l'enrichissement vaut 28 % et la différence de stabilité des diastéréoisomères vaut environ 2 kJ/mole. Le peptide AspAlaGly donne en général de plus grands $\chi_{R/S}$ que les deux autres. Qualitativement, relativement aux ligands AspGlyGly, AspAlaGly et AspGlyAla, les suites des acides aminés par ordre décroissant de $\chi_{R/S}$ sont respectivement : Pro > Arg > Lys > Ser ~ Ala, Pro > Arg > Lys > Ser > Ala, et Pro > Arg > Lys ~ Ala ~ Ser. Il est intéressant de comparer ces 3 suites avec celles obtenues à partir des écarts des $\log \beta_{1011}$ expérimentaux et statistiques (tableau 9) par ordre croissant de Δ_{1011} : Pro-Arg-Ala-Ser-Lys, Pro-Arg-Ser-Ala-Lys, et Pro-Arg-Ala-Ser-Lys. Ces suites sont semblables pour chaque peptide (à l'exception de la position de Lys).

Relativement au complexe $M(H_{-1}L)X$, la plus grande diastéréosélectivité apparente s'observe pour le système Cu^{2+} -AspGlyAla-Pro, dont l'enrichissement vaut 7 %. Les valeurs $\chi_{R/S}$ sont plus grandes avec le peptide AspGlyAla qu'avec les deux autres. Relativement aux ligands AspGlyGly et AspGlyAla, les suites des acides aminés par ordre décroissant de $\chi_{R/S}$ sont respectivement : Arg ~ Ser > Pro ~ Ala > Lys et Pro > Ser > Ala ~ Lys > Arg. Les deux suites d'acides aminés classés par Δ_{1-111} sont alors : Pro-Ala-Arg-Ser-Lys et Pro-Ser-Ala-Arg-Lys. Les suites correspondantes sont relativement semblables, surtout celles du peptide AspGlyAla dont les effets de diastéréosélectivité sont plus marqués.

Ainsi les écarts des constantes de stabilité des complexes ternaires par rapport aux prédictions statistiques constituent une

méthode qualitative pour évaluer les potentialités de diastéréosélectivité, car ils sont dûs à des interactions entre les deux ligands coordonnés (26).

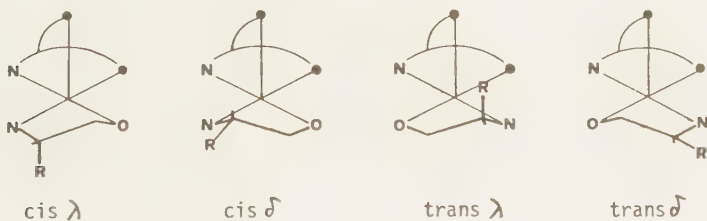
6.5 Stéréochimie des complexes ternaires

6.5.1 Hypothèses

Les structures probables des complexes MLX et $M(H_{-1}L)X$ sont semblables à celles des complexes $M(Asp)X$ par la disposition des cycles de chélation, et des isomères cis et trans sont en équilibre en solutions. Si la conformation λ de Asp est supposée (reste β -carboxylate coordonné), huit conformères peuvent être envisagés (figure 38).

Acide aminé de configuration S

λ : axial, δ : équatorial



Acide aminé de configuration R

λ : équatorial, δ : axial

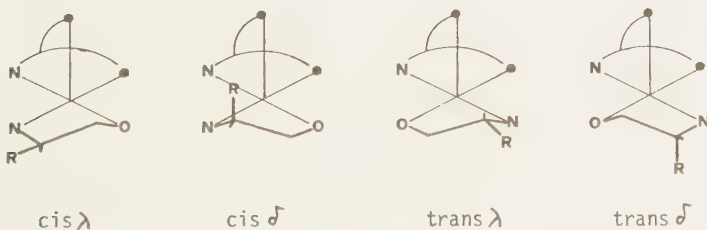


Figure 38 : conformations possibles de l'acide aminé (• = N ou O)

Nous envisageons plusieurs types d'interactions qui ont une influence sur la stabilité de certains conformères.

Les fonctions aminos des isomères cis peuvent être soit éclipsées, soit décalées (figure 39). La conformation $cis\lambda$ de l'acide aminé est préférable à $cis\delta$.

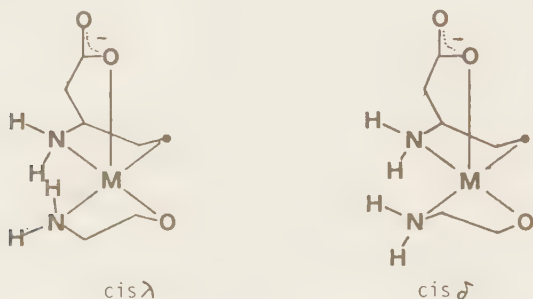


Figure 39

Le reste R de l'acide aminé sera de préférence en position équatoriale, sauf s'il est volumineux ou coordinateur (23).

Les peptides étudiés permettent des interactions électrostatiques (48 - 50) qui favorisent une conformation ayant le reste de l'acide aminé en position axiale s'il est petit (figure 40 A) et équatoriale s'il est grand (figure 40 B).

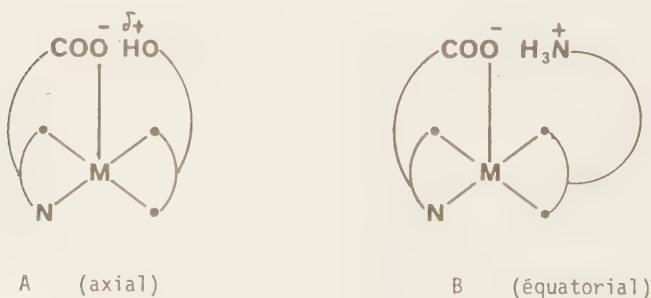


Figure 40

Les observations de diastéréosélectivité étant semblables pour les deux complexes ternaires, nous pensons que les spéculations relatives au complexe $M(H_1L)X$ sont valables également pour MLX . Un mécanisme analogue à celui de la figure 28 peut alors être envisagé pour MLX (figure 41).

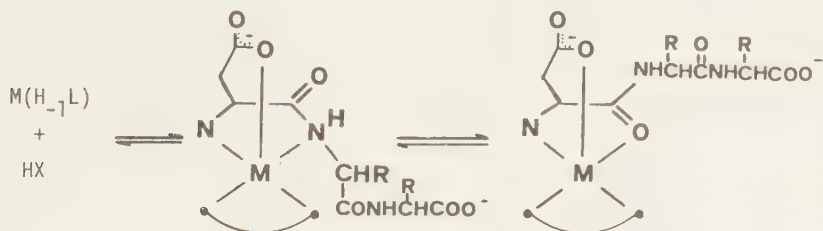


Figure 41 : proposition du mécanisme de la formation de MLX

6.5.2 Interprétation des spectres CD et VIS

La règle de l'hexadécant décrit généralement bien le signe de l'effet Cotton des complexes du cuivre(II) avec les acides aminés et les peptides (43,44), mais ne donne pas d'information sur l'isomérisation *cis/trans* (39,44). Par contre, des études semithéoriques ont permis de calculer les contributions conformationnelles et vicinales qui influencent les propriétés spectroscopiques des isomères *cis* et *trans* (38,56,62,63). Lorsque les isomères *cis* et *trans* sont séparables (par exemples les complexes du $Pd(II)$ et $Pt(II)$), les bandes d'absorption de l'isomère *trans* sont plus larges que celles de l'isomère *cis* (61).

Lorsque $X = Ala$, le spectre VIS de $M(H_1L)X$ (figure 34) a une largeur de bande supérieure quand la configuration de X est *S*. Cette différence peut être attribuée à un rapport des concentrations des isomères *trans* et *cis* ($[trans]/[cis]$) supérieur

dans le cas de (S)Ala. L'équilibre $\text{cis}\delta \rightleftharpoons \text{trans}\delta$ du complexe de la (S)Ala est plus déplacé à droite que l'équilibre $\text{cis}\lambda \rightleftharpoons \text{trans}\lambda$ de la (R)Ala (groupes aminos éclipsés dans le conformère $\text{cis}\delta$).

Ainsi, le changement de configuration de X produit un changement du rapport des isomères cis-trans, si bien que la diastéréosélectivité apparente est faible.

La fonction amine de la proline est encombrée (substituée par le reste $-(\text{CH}_2)_3$), ce qui déstabilise l'isomère cis : la proportion $[\text{trans}]/[\text{cis}]$ est donc beaucoup plus grande qu'avec l'alanine, et les spectres VIS ont des ϵ élevés (environ $100 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) (figure 34). Les coefficients d'absorption du complexe de la (S)Pro dépassent légèrement ceux de la (R)Pro. Cela signifie que les isomères cis existent et que l'interaction des fonctions aminos influencent le rapport $[\text{trans}]/[\text{cis}]$.

Le reste guanidinium (chargé positivement) caractérise l'arginine. Une interaction électrostatique avec le reste β -carboxylate peut exister. Elle favorise certainement le conformère du type B, figure 40, et une diastéréosélectivité nettement plus grande qu'avec l'alanine s'observe.

Une diastéréosélectivité apparente en faveur de la (R)Ser s'observe, mais les spectres VIS des diastéréoisomères sont identiques. Cela peut signifier que les rapports $[\text{trans}]/[\text{cis}]$ ne sont pas modifiés. Elle ne peut pas s'expliquer par une interaction électrostatique avec le reste β -carboxylate ($\chi_{R/S}$ serait < 1). Le reste doit donc être en position équatoriale favorable dans un milieu polaire.

En principe, la lysine pourrait se comporter comme l'arginine, mais la fonction guanidinium se différencie nettement du reste $\omega\text{-NH}_3^+$ par une structure triazotée et un pKa plus élevé. Ainsi, les possibilités de coordination de la lysine sont accrues ($\omega\text{-NH}_2$ coordonné et α -ammonium libre), et aucune diastéréosélec-

tivité n'est observée.

L'application de la règle de l'hexadécant permet de calculer une approximation de deux fois la contribution de l'acide aminé en soustrayant les spectres CD (figures 35, 36 A' - E' (—)) et une approximation de deux fois la contribution du peptide en additionnant les spectres CD (figures 35, 36 A'-E', (.....)).

Sur les figures 35 et 36 A' - E' (—), les contributions des acides aminés sont comparables aux spectres de MX_2 (figure 33) et sont du même ordre de grandeur pour les deux peptides.

La contribution de Asp du peptide AspGlyGly (figure 35) apparaît avec un faible effet Cotton négatif d'environ $-0.05 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. En l'absence d'acide aminé, le spectre CD est positif pour le complexe $M(H_2L)$ (cf. figure 10) avec un $\Delta\epsilon \approx 0$ vers $\lambda = 550 \text{ nm}$.

La particularité d'un tel spectre par rapport à celui de peptides linéaires était attribuée à la coordination du reste β -carboxylate (cf. 4.3.3). En présence d'un acide aminé, le minimum du spectre CD vers $\lambda = 550 \text{ nm}$ devient légèrement négatif, tandis que le maximum vers $\lambda = 670 \text{ nm}$ reste positif. Cette différence pourrait être attribuée à une diminution de l'abondance du conformère ayant le reste β -carboxylate coordonné.

La contribution CD du ligand AspGlyAla (figure 36) est semblable avec chaque acide aminé. Un $\Delta\epsilon_{\min}$ d'environ $-0.11 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ est compatible avec les structures proposées (coordination du peptide par N-amino et N-peptide) (46).

6.6 Conclusions

Dans nos systèmes, la formation des complexes ternaires est faiblement diastéréosélective en faveur des acides aminés de configuration R. Cependant, lorsqu'un système Cu^{2+} -tripeptide-acide aminé (où les configurations sont toutes S) est perturbé par le changement de la configuration de X, des propriétés stéréochimiques

observables se manifestent.

La stabilisation des complexes ternaires par rapport aux prédictions statistiques dépend des interactions entre les ligands coordonnés. Ces interactions interviennent également dans les phénomènes de diastéréosélectivité.

Le mécanisme proposé de la formation des complexes ternaires est cohérent avec l'influence sur la diastéréosélectivité des complexes MLX et $M(H_1L)X$ des restes en position 2 et 3 du tripeptide respectivement.

Un mélange d'isomères cis et trans existe toujours. La proportion de ces isomères dépend beaucoup de X. Une structure trans est favorisée par une fonction α amino substituée (Pro). Un reste volumineux et chargé positivement limite les possibilités de structures et de conformations par une interaction électrostatique avec le reste β -carboxylate du peptide.

Par contre, les possibilités de structures sont augmentées lorsque X possède un reste basique (par exemple Lys).

Dans le complexe $M(H_1L)X$, il est possible que le bras β -carboxylate soit coordonné dans une mesure moindre qu'il l'est dans le complexe $M(H_2L)$, mais l'interprétation des spectres CD et VIS satisfait les structures de la figure 20 B.

7 SYSTEME NATUREL ET MODELES

=====

7.1 Introduction

Dans les chapitres qui précèdent, nous avons décrit des systèmes comprenant le cuivre(II), des tripeptides (ayant Asp en position 1) et des acides aminés bidentés (différents de His). Ils sont caractérisés par deux types principaux de complexes ternaires, la stabilisation du complexe MLX par la coordination du reste β -carboxylate en position 1 du tripeptide, l'inhibition par un reste aliphatique en position 2 du tripeptide de la formation du complexe $M(H_1L)X$, et le caractère essentiellement planaire des complexes.

Un autre type de systèmes, qui décrit bien le site actif de l'albumine, a été très étudié. Il comprend des tripeptides ayant His en position 3 du tripeptide (par exemple GlyGlyHis) dans des systèmes binaires (13,15,18,19) et ternaires (4,16,17,72).

De tels systèmes se différencient des autres par la présence du reste imidazole en position 3 du tripeptide et dans l'acide aminé.

Il s'agit de comparer nos systèmes (dépourvus d'histidine) avec le système Cu^{2+} -GlyGlyHis-His, afin d'essayer d'expliquer le rôle de l'histidine dans le système naturel à l'aide de nos résultats obtenus à partir de systèmes simplifiés (la présence de la fonction imidazole complique fondamentalement les systèmes qui le comprennent).

7.2 Conditions du système naturel

Dans le sérum humain, seulement environ 5 % du cuivre total existe sous forme de complexes labiles ⁽²⁾, c'est-à-dire une concentration de l'ordre de 10^{-6} M. L'albumine est présente en concentration

d'environ 5.10^{-4} M. La concentration de X dépend de l'acide aminé, et est de l'ordre de 3.10^{-5} - 5.10^{-4} M. Celle de l'histidine vaut environ 10^{-4} M (65).

Dans ces conditions, les distributions des espèces des systèmes Cu^{2+} -AspGlyAla-Ala et Cu^{2+} -AspAlaGly-Ala (figure 42) sont modifiées par rapport à celles de la figure 21.1.

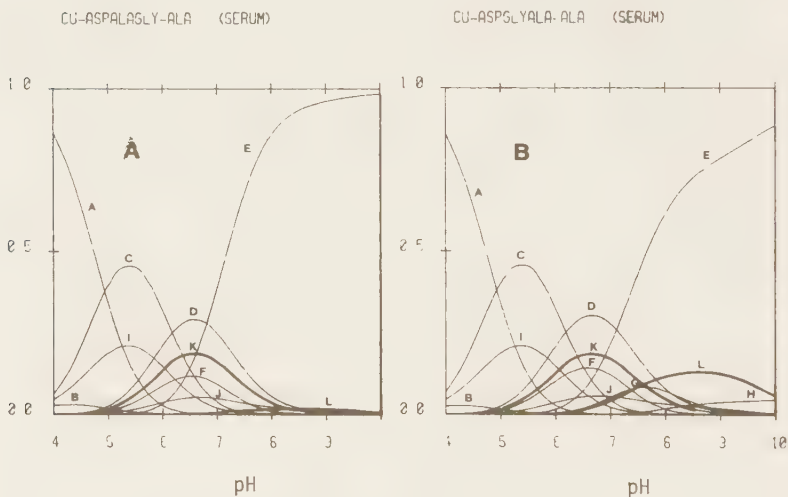


Figure 42 : simulation des systèmes Cu^{2+} -tripeptide-Ala dans les conditions physiologiques.

A: L = AspAlaGly, B: L = AspGlyAla

($C_M = 10^{-6}$ M, $C_L = 5.10^{-4}$ M, $C_X = 2.10^{-4}$ M)

A Cu^{2+} , B $\text{M}(\text{HL})$, C ML , D $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})$, E $\text{M}(\text{H}_{-2}\text{L})$, F ML_2 ,

G $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})\text{L}$, H $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})_2$, I MX , J MX_2

trait renforcé: K MLX , L $\text{M}(\text{H}_{-1}\text{L})\text{X}$

Des concentrations en métal et ligands très petites ont pour conséquences une plus grande abondance en Cu^{2+} libre et un moins bon

rendement dans la formation des complexes ternaires. L'excès de tripeptide par rapport à l'acide aminé favorise les espèces MH_hL_1 (courbes B - H). Ainsi, dans les conditions physiologiques (de concentrations) et à un pH = 7.4, les abondances en complexes MH_hLX et MH_hL valent 10 % et 83 % respectivement (figure 42 A) ou 18 % et 77 % respectivement (figure 42 B).

L'effet du reste en position 2 du tripeptide est amplifié dans ces conditions de concentrations totales en M, L et X.

Les distributions de la figure 43 sont des simulations. Dans ces conditions de concentrations, les espèces $Cu(OH)_2$ et $CuCO_3$ deviennent compétitives ⁽⁷³⁾, du fait de la concentration totale en carbonate d'environ 27 mM dans le sérum.

Dans les mêmes conditions de concentrations, les distributions des espèces du système Cu^{2+} -GlyGlyHis-His ont été calculées à partir des constantes de la littérature ^(15,17) (figures 43 A et B).

Ces figures, qui diffèrent grandement, montrent que des conditions expérimentales et des méthodes de calcul différentes peuvent aboutir à des jeux de constantes disparates.

L'abondance en complexes ternaires vaut 63 % ou 17 % suivant les auteurs.

Ici également, il faudrait tenir compte de la présence en carbonate dans les simulations des conditions du système naturel (sérum).

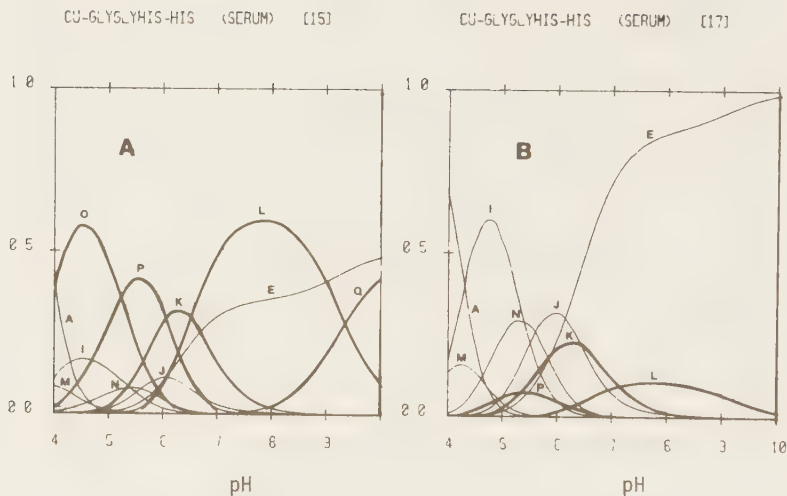


Figure 43 : simulation du système Cu^{2+} -GlyGlyHis-His dans les conditions physiologiques

$$(C_M = 10^{-6} \text{ M}, C_L = 5 \cdot 10^{-4} \text{ M}, C_X = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M})$$

A Cu^{2+} , E $\text{M}(\text{H}_2\text{L})$, I MX , J MX_2 , M $\text{M}(\text{HX})$, N $\text{M}(\text{HX})\text{X}$,
 trait renforcé: K $\text{M}(\text{H}_1\text{L})(\text{HX})$, L $\text{M}(\text{H}_2\text{L})(\text{HX})$,
 O MH_2LX , P MHLX , Q $\text{M}(\text{H}_2\text{L})\text{X}$

7.3 Rôle de l'imidazole

Le rôle de His en position 3 du tripeptide est important : la coordination du reste imidazole à la place du carboxylate terminal dans l'espèce $\text{M}(\text{H}_2\text{L})$ ⁽¹³⁾ augmente tellement la stabilité de cette espèce ($\log \beta_{1-210}$ supérieur de 4.8 unités log. à celle du système comprenant le peptide GlyGlyGly) par la présence d'un azote supplémentaire dans le plan du complexe que l'espèce $\text{M}(\text{H}_2\text{L})$ est la seule observable de composition MH_nL_1 (figure 44).

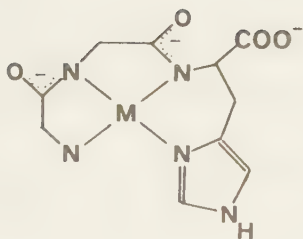


Figure 44 : structure du complexe $M(H_2GlyGlyHis)$ (15,72)

Les constantes de formation β_{1h0x} des complexes de l'histidine avec le cuivre(II) sont également supérieures à celles des acides aminés simples⁽⁴⁰⁾, car l'histidine possède trois dents, dont deux azotées. Ainsi, les complexes ternaires sont beaucoup plus stables que ceux de nos systèmes ($\log \beta_{1hl}$ supérieurs de 4 - 5.5 unités $\log$ d'après les valeurs de la littérature⁽¹⁵⁾). Le pK_a du reste HIm se situe entre 3 et 6 dans les complexes, si bien que le nombre d'espèces MH_hX_x est supérieur à 2 (figure 43), mais le nombre des structures est supérieur à 6⁽²⁸⁾: His tridenté ou bidenté par O-Im, O-N ou N-Im. Ces particularités de l'histidine font que cinq types de complexes ternaires peuvent exister (d'après⁽¹⁵⁾). En milieu proche de la neutralité, les espèces $M(H_{-1}L)(HX)$ et $M(H_{-2}L)(HX)$ sont présentes (dans nos systèmes, il s'agit de MLX et $M(H_{-1}L)X$). Mais les structures sont d'un type différent (15) (figure 45 A et B).

La question est de se demander pourquoi le site actif de l'albumine est spécifique de l'histidine.

Dans nos systèmes, tous les acides aminés bidentés (ainsi que Lys), ont un comportement semblable : constantes de formation de même ordre de grandeur et structures identiques (sauf peut-être Lys) des complexes ternaires. Les acides aminés en position 2 ou 3 du

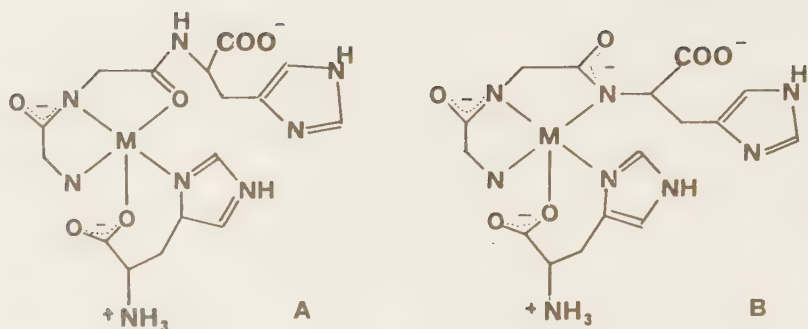


Figure 45 : structure proposée par Sarkar et coll. (15)

A : $M(H_1L)(HX)$, B : $M(H_2L)(HX)$

tripeptide (Gly ouAla) n'affectent que faiblement les propriétés thermodynamiques des complexes métal-peptide vis-à-vis des acides aminés.

La présence de la fonction imidazole en position 3 du tripeptide stabilise tellement l'espèce $M(H_2L)$ (figure 44) que la formation de complexes ternaires dans des systèmes Cu^{2+} -dipeptide.His-acide aminé simple, à un pH proche de la neutralité, deviendrait certainement problématique.

Un acide aminé tridenté constitue déjà une sélection, mais pas dans nos systèmes où des complexes ternaires d'acides aminés simples se forment déjà. Par contre, dans les systèmes comprenant un ligand ayant His en position 3, les structures A et B (figure 45) peuvent formellement exister avec $X = Arg$ ou Lys . C'est là qu'intervient une caractéristique de l'histidine : le reste HIm est plus acide que la fonction α ammonium, contrairement aux restes guanidinium et $\omega-NH_3^+$. Les conséquences sont importantes. L'histidine est coordonnée par l'imidazole et le carboxylate, tandis que la fonction α amino est protonée. Un cycle de chélation à sept membres est favorable avec une position axiale du cuivre(II).

La stabilité des complexes ternaires, due à la coordination de l'imidazole et au pKa bas de l'HIm, a pour conséquence un maximum d'abondance vers pH = 6.3 de $M(H_{-1}L)(HX)$ et vers pH = 7.9 de $M(H_{-2}L)(HX)$ (figure 43), c'est-à-dire que la coordination des azotes peptidiques apparaît à des pH plus de 2.5 unités plus bas que dans nos systèmes. Les complexes ternaires présents vers pH = 7.4, ayant les structures A ou B (figure 45), ne peuvent plus être défavorisés par un reste méthyle en position 2 du peptide.

Lorsque le pH = 7.5, la glycine réagit avec $[Cu(H_{-2}GlyGlyHis)]^-$ environ 40 fois plus lentement que l'histidine ⁽⁷²⁾. Ce résultat, ainsi que les propriétés thermodynamiques des systèmes étudiés, suggèrent que l'histidine est vraiment favorisée vis-à-vis des autres acides aminés. Dans le cas où des complexes ternaires se formeraient avec des acides aminés bidentés, la coordination de X se ferait certainement dans le plan du complexe, car un cycle de chélation à cinq membres avec une position axiale est peu probable. De plus, le deuxième acide aminé de l'albumine est substitué, si bien que les complexes ternaires $M(H_{-1}L)X$ seraient encore défavorisés par l'effet d'inhibition stérique du reste en position 2 du tripeptide.

7.4 Conclusions

Les études des complexes peptidiques du cuivre(II) avec des acides aminés, en tant que modèle du site actif de l'albumine, peuvent être basées sur plusieurs types de systèmes. Ceux fondés sur l'histidine (en tant que troisième acide aminé du peptide et second ligand) offrent l'avantage de posséder des propriétés thermodynamiques et spectroscopiques semblables à celles du système His-Cu²⁺-albumine. Mais la complexité des systèmes cache les facteurs qui influencent les propriétés des complexes ternaires.

Nos systèmes simplifiés par l'absence de la fonction imidazole,

sont limités par le fait que les propriétés thermodynamiques, spectroscopiques et structurales des complexes ternaires sont différentes de celles du système naturel. Les informations relatives à nos systèmes sont donc complémentaires à celles faites à partir des systèmes fondés sur l'histidine. C'est la raison pour laquelle nos résultats concernant le rôle de Asp terminal sur la stabilisation du complexe MLX, le rôle du reste en position 2 du peptide sur l'inhibition stérique des complexes $M(H_{-1}L)X$, et les propriétés qualitativement semblables des acides aminés vis-à-vis des effets produits par les substituants des peptides, semblent peu utiles pour comprendre le système naturel.

Cependant, la comparaison des propriétés thermodynamiques, spectroscopiques et structurales de nos systèmes avec ceux fondés sur l'histidine, a permis de mieux comprendre comment la présence supplémentaire à nos systèmes d'une fonction azotée coordinatrice et peu basique peut modifier le comportement des complexes cuivre(II)-peptide avec des acides aminés en favorisant l'action d'un acide aminé, l'histidine.

8 PARTIE EXPERIMENTALE

=====

8.1 Méthodes analytiques

8.1.1 Titrages potentiométriques

Nous avons utilisé, pour la préparation des solutions, les substances suivantes : peptides (cf. 8.2), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck), acides aminés Ala, Pro, Arg, Ser, Lys.HCl (puriss, Fluka), et de l'eau bidistillée dégazée.

Les solutions à titrer sont préparées juste avant l'emploi. La solution titrante de NaOH environ 0.1 M, préparée avec des pastilles lavées, contenant également KNO_3 0.1 M, est conservée dans un flacon en plastic protégé par de la chaux sodée.

Des solutions contenant Cu^{2+} env. 0.01 M + KNO_3 0.2 M + acide aminé env. 0.01 M sont préparées (stock de 100 ml) à partir d'une solution mère de Cu^{2+} env. 0.02 M, des pesées de KNO_3 et de l'acide aminé, et d'eau bidistillée dégazée légèrement chloroformée (pour prévenir des moisissures).

Les solutions de peptides env. 0.01 M sont préparées avant l'emploi et ne sont pas conservées plus longtemps que la durée d'une série de mesures.

Trois méthodes de préparation et de titrage ont été utilisées généralement (cf. tableaux 8 et 11) : a) pipettages de 10 ml des solutions de peptide et de $\text{Cu}^{2+} + \text{X}$ (ou Cu^{2+} , ou d'eau) ($V_0 = 20$ ml) dans une cellule Metrohm; barbotage d'azote (désoxygéné et thermostatisé) pendant 5 mn, titrage sous azote à l'aide d'une burette Metrohm E415. b) pipettages de 2 ml des solutions de peptide et de $\text{Cu}^{2+} + \text{X}$ (ou Cu^{2+} , ou d'eau), ($V_0 = 4$ ml) dans une cellule Metrohm, titrage sous azote (désoxygéné et thermostatisé à 25°) à l'aide d'une miniburette Gilmont (contenance 2 ml, 1 division = 2 ml). c) comme b), mais en pesant les solutions ($V_0 = 4$ ml).

L'addition de base se fait régulièrement dans le temps (généralement 1 addition/45 s) pour les systèmes ternaires.

Le pH mètre utilisé est un Radiometer PHM64, muni d'une électrode GK2401B. Les mesures de pH sont corrigées en fonction du pH et de $[Na^+]$. Il est étalonné par des solutions tampons : hydrogénéphthalate de potassium 0.05 M (pH 4.008 à 25⁰) et $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 0.01 M (pH 9.180 à 25⁰) préparées avec des substances pour étalons de pH selon DIN19266. Des stocks de 250 ml sont généralement préparés et conservés dans des bouteilles pleines de 100 ml en plastique. Des portions neuves de 50 ml sont utilisées pour chaque série de mesures.

1.2 Spectres VIS

Les spectres d'absorption sont mesurés par le spectrophotometer Unicam SP1800 (accessoirement SP800). Les solutions sont contenues dans une cuve thermostatisée de 1 cm et sont préparées comme sous 8.1.1 (mais addition rapide de base). Le calcul des coefficients ϵ à partir des spectres (amplitude I) s'effectue par la relation

$$\epsilon = \frac{L[cm] * S}{25[cm] * C[M] * l[cm]}$$

valable pour une sensibilité S (densité optique) correspondant à une amplitude $L = 25$ cm (recorder Unicam AR25) et une cuve de 1 cm.

1.3 Spectres CD

Les spectres de dichroïsme circulaire sont mesurés par le spectropolarimeter Jasco J-500C. Les solutions sont contenues dans une cuve de 1 cm à température ambiante et sont préparées comme sous 8.1.2. L'appareil est traversé par un flux d'azote (y compris le trajet optique). Le calcul des coefficients $\Delta \epsilon$ s'effectuent par la relation :

$$\Delta \epsilon = \frac{L[\text{cm}] * S[\text{m}^0 \text{cm}^{-1}]}{3.3 * 10^4 * C[\text{M}] * l[\text{cm}]}$$

valable pour une sensibilité S (ellipticité φ) et une cuve de 1 cm.

8.1.4 Calculs par ordinateur

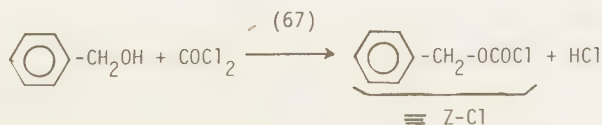
Les programmes SCOGS et COMICS (32,33) (calcul des constantes β_{mhlx} et distribution des espèces en fonction du pH) ont été modifiés afin de rendre interactives les lectures. Une version dérivée de COMICS a été créée pour obtenir des sets de coordonnées des points d'un choix de courbes de distributions. Un autre programme peut les utiliser pour dessiner les diagrammes de distributions.

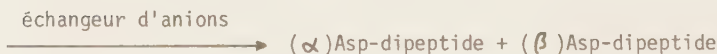
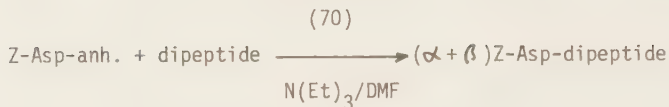
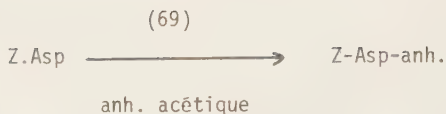
Le calcul des coefficients ϵ et $\Delta\epsilon$ (tous les 10 nm) ont été effectués par de petits programmes qui tiennent compte de la présence de 1 - 5 espèces colorées. Deux programmes permettent alors de dessiner 1, 2 ou plusieurs spectres.

Tous ces programmes font partie d'une collection (34).

8.2 Synthèse des peptides

8.2.1 Organigramme





.2 Z-Cl

Du chloroformate de benzyle est préparé à partir de solution à 20% de phosgène dans le toluène selon la voie classique ⁽⁶⁷⁾.

.3 Z-Asp

Une quantité de Z-Asp a été préparée par la méthode de Bergmann et Zervas ⁽⁶⁸⁾ à partir de 0.4 mole d'acide aspartique.

.4 Z-Asp-anh.

Une réserve d'anhydride de Z-Asp a été constituée par la méthode de John et Young ⁽⁶⁹⁾ à partir de 0.25 mole de Z-Asp.

.5 ($\alpha + \beta$)Asp-dipeptide

A partir d'environ 30 mmole de dipeptide, l'application de la méthode de Buchanan et al. ⁽⁷⁰⁾ fournit un mélange de α et β - tripeptide, d'acide aspartique et de dipeptide, et permet d'obtenir le tripeptide (α)Asp-dipeptide cristallisé relativement facilement.

8.2.6 Purification des peptides (α)Asp-dipeptide

Par chromatographie sur couche mince, il est aisé d'analyser qualitativement les fractions d'éluates et de tester la pureté des peptides. Beaucoup de solvants et de phases peuvent être utilisés pour séparer des peptides et des acides aminés ⁽⁷¹⁾. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec le mélange de solvants n-butanol-acide acétique-eau 3:1:1. La révélation des acides aminés et peptide se fait par une solution de ninhydrine 0.3% dans un mélange n-butanol-acide acétique 95:5 à chaud ($> 110^0$). Pour révéler des dérivés protégés (par Z), une décomposition préalable par une solution de HBr dans AcOH+EtOH est nécessaire. La couleur des spots dépend fortement de la phase. Le meilleur résultat a été obtenu avec les plaques de Cellulose F₂₅₄ (Merck) avec révélateur de fluorescence. Le tableau 13 donne les caractéristiques de quelques substances :

Tableau 13

substance	R _F	couleur à la révélation
(α)AspGlyGly	0.21	jaune
(β)AspGlyGly	0.16	bleu
(α)AspAlaGly	0.28	jaune
(β)AspAlaGly	0.24	bleu
(α)AspGlyAla	0.20	jaune
(β)AspGlyAla	0.15	bleu
Asp	0.14	rouge

La séparation de (α)Asp-dipeptide des autres molécules a été réalisée à l'aide d'une colonne ($\emptyset$ 3.5 cm, hauteur 75 cm) remplie de Sephadex QAE A25 chargé en formiate.

Un premier passage sur la colonne permet d'obtenir en partie l'isomère α pur et d'éliminer une grande partie de l'isomère β (toujours plus abondant que l'isomère α) et Asp. Un deuxième passage du reste des fractions contenant de l'isomère α permet alors

de l'obtenir pur.

De façon générale, la chromatographie sur colonne débute par l'élution d'environ 0.5 l d'eau, puis par une solution d'acide formique diluée (4 ml/l). Le dipeptide qui n'a pas réagi sort de suite. L'isomère α sort en tête (après plus de 0.5 l d'éluant). Puis un mélange d'isomères $\alpha + \beta$ et Asp apparaît, et enfin l'isomère β pur. Le volume total d'éluant peut varier de 2 à 4 l suivant le peptide, la proportion d'isomères α et β , et le tassement de la colonne.

Les fractions contenant l'isomère α sont concentrées, puis introduites sur une petite colonne ($\emptyset$ 1 cm, hauteur 10 cm) remplie de Dowex 50X8 chargée en H^+ . L'élution par de la pyridine 1 M fournit une solution concentrée de (α)tripeptide ⁽⁷⁰⁾.

L'isomère α pouvant s'isomériser en isomère β , il doit être manipulé (chromatographie sur colonne, concentrations) le plus rapidement possible et à des températures inférieures à 30°. Il est conseillé de concentrer les grands volumes de solution par fractions de 100 ml.

La purification finale des peptides se fait par recristallisations répétées (plus de cinq fois). Pour se faire, le peptide est dissous à température ambiante dans le volume minimum d'eau. L'addition d'un volume généralement cinq fois plus grand d'éthanol donne une solution limpide tiède. La cristallisation du produit s'opère spontanément par refroidissement à 0°, puis à -20°.

7 Description du tripeptide (α)AspAlaGly

Les peptides (α)AspGlyGly et (α)AspGlyAla sont décrits ⁽⁷⁰⁾. Par contre la synthèse du peptide (α)AspAlaGly n'a jamais été décrite (à notre connaissance). Par analogie à la synthèse des autres peptides, nous avons pu préparer ce ligand.

Les analyses de (α)AspAlaGly ont fourni les résultats suivant :

Analyse élémentaire CHN

trouvé :	C 41.22	H 5.83	N 15.96
calculé:	C 41.38	H 5.75	N 16.09

Point de fusion = 205°

$[\alpha]_D = -24.4$ (c = 2, eau)

Constantes d'acidité ($\mu = 0.1$ KNO₃, T = 25°)

$pK_{a1} = 2.78$

$pK_{a2} = 3.79$

$pK_{a3} = 7.84$

9 RESUME

=====

Dans les systèmes biologiques, la formation de complexes entre le Cu(II), des peptides et des acides aminés joue un rôle important dans le transport du cuivre. Afin d'étudier certains facteurs qui affectent la formation de complexes ternaires, des systèmes relativement simples sont choisis. Ils comprennent trois peptides ($L = \alpha\text{-AspGlyGly}, \alpha\text{-Asp-AlaGly}, \alpha\text{-AspGlyAla}$) et cinq acides aminés bidentés (Ala, Pro, Arg, Ser, Lys) et sont étudiés par des méthodes potentiométriques et spectroscopiques.

Deux types principaux de complexes ternaires sont détectés. L'espèce MLX existe à des pH compris entre 5 et 8, et $M(H_{-1}L)X$ à des $pH > 7$. Ils constituent généralement les complexes principaux, avec MX_2 et $M(H_{-2}L)$. Suivant X, le maximum d'abondance de MLX vaut 30 - 45 %, et celui de $M(H_{-1}L)X$ 35 - 60 %. Les constantes de formation de $M(H_{-1}L)X$ et, dans une moindre mesure, celles de MLX sont supérieures à celles prévues par des calculs statistiques, et dépendent de X.

Le reste β -carboxylate (en position 1 du tripeptide) est coordonné dans le complexe MLX et le stabilise nettement par rapport aux peptides sans ramification. Par contre, dans le complexe $M(H_{-1}L)X$, il n'est certainement que partiellement coordonné et affecte peu la stabilité du complexe.

Un reste méthyle en position 2 du tripeptide défavorise drastiquement la formation des complexes $M(H_{-1}L)X$, mais pas celle de MLX. Cet effet d'inhibition stérique augmente avec la grandeur du reste de X, sauf s'il est coordonnable (Lys). ✓

Les acides aminés sont bidentés et coordonnés dans le plan M-peptide. Un mécanisme de la formation des complexes ternaires est proposé.

L'étude stéréochimique de la formation des complexes ternaires (qui montre une diastéréosélectivité apparente en faveur des acides aminés de configuration R), confirme le mécanisme de formation et la relation entre les interactions peptide-acide aminé et les écarts des constantes

de formation par rapport aux prédictions statistiques. Elle met également en évidence les mélanges d'isomères cis et trans.

Nos systèmes, ainsi que His-Cu(II)-GlyGlyHis sont extrapolés dans les conditions de concentrations et de pH du système naturel (sérum).

La comparaison des propriétés thermodynamiques, spectroscopiques et structurales de ces deux types de systèmes permet de mieux comprendre, dans le système His-Cu(II)-albumine, le rôle spécifique de l'histidine dû à la présence d'une fonction azotée coordinatrice et peu basique qu'est la fonction imidazole.

10 BIBLIOGRAPHIE

=====

- (1) E. Breslow, in *Inorganic Biochemistry*, vol. I, p.242, éd. G.L. Eichhorn, Elsevier, London 1973
- (2) B. Sarkar, T.P.A. Kruck, in *The Biochemistry of Copper*, p.183, Academic Press, London 1966
- (3) A. Ecabert-Brandt, thèse, Université de Neuchâtel (1977)
- (4) S.J. Lau, B. Sarkar, *J. Biol. Chem.* 246, 5938 (1971)
- (5) D.W. Margerum et al., *Adv. Chem. Ser.* 162, 281 (1977)
- (6) E.J. Billo, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 40, 1971 (1978)
- (7) A. Kaneda, A.E. Martell, *J. Coord. Chem.* 4, 137 (1975)
- (8) A. Gergely, I. Nagypal, *J.C.S. Dalton* 1977, 1104
- (9) R.P. Agarwal, D.D. Perrin, *J.C.S. Dalton* 1977, 53
- (10) R.P. Martin, L. Mosoni, *J. Biol. Chem.* 246, 5944 (1971)
- (11) I. Nagypal, A. Gergely, *J.C.S. Dalton* 1977, 1109
- (12) S. Lau, B. Sarkar, *Can. J. Chem.* 53, 710 (1975)
- (13) S. Lau, T.P.A. Kruck, B. Sarkar, *J. Biol. Chem.* 249, 5878 (1974)
- (14) N. Camerman, A. Camerman, B. Sarkar, *Can. J. Chem.* 54, 1309 (1976)
- (15) T.P.A. Kruck, S. Lau, B. Sarkar, *Can. J. Chem.* 54, 1300 (1976)
- (16) T.P.A. Kruck, B. Sarkar, *Inorg. Chem.* 14, 2383 (1975)
- (17) T. Sakurai, A. Nakahara, *Inorg. Chim. Acta.* 34, L245 (1979)
- (18) G. Arena, E. Rizzarelli, B. Sarkar, *Inorg. Chim. Acta.* 37, L555 (1979)
- (19) K.S. Iyer, S. Lau, S.H. Laurie, B. Sarkar, *Biochem. J.* 169, 61 (1978)
- (20) G.R. Dukes, D.W. Margerum, *JACS* 94, 8414 (1972)
- (21) H. Hauer, G.R. Dukes, D. Margerum, *JACS* 95, 3515 (1973)
- (22) G.F. Bryce, F.R.N. Gurd, *J. Biol. Chem.* 241, 1439 (1966)
- (23) K. Bernauer, in *Topics in Current Chemistry*, vol.65, Springer Verlag (1976)
- (24) J. Csaszar, J. Balog, *Acta. Phys. Chem.* 23, 419 (1977)
- (25) G. Colomb, thèse, Université de Neuchâtel (1975)
- (26) V.S. Sharma, J. Schubert, *J. Chem. Educ.* 46, 506 (1969)

- (27) D.W. Margerum, G.R. Dukes, in *Metal Ions in Biological Systems*, vol 1, éd. H. Sigel, Marcel Dekker, N.Y 1974
- (28) T.P.A. Kruck, B. Sarkar, *Can. J. Chem.* 51, 3563 (1973)
- (29) A.E. Martel, M.K. Kim, *J. Coord. Chem.* 4, 9 (1974)
- (30) E.J. Billo, *Inorg. Nucl. Chem. Letters* 10, 613 (1974)
- (31) K.W. Nickerson, N.F. Phelan, *Bioinorg. Chem.* 4, 79 (1974)
- (32) I.G. Sayce, *Talanta* 15, 1397 (1968)
- (33) D.D. Perrin, I.G. Sayce, *Talanta* 14, 833 (1967)
- (34) D. Perret, collection de programmes, non publiée, Université de Neuchâtel (1980)
- (35) G.F. Bryce, *J. Phys. Chem.* 70, 3549 (1966)
- (36) L. Sportelli, H. Neubacher, W. Lohmann, *Biophys. Struct. Mechanism* 3, 317 (1977)
- (37) H. Kozłowski, B. Jezowska-Trzebiatowska, *J. Inorg. Nucl. Chem.* 39, 1275 (1977)
- (38) R.W. Strickland, F.S. Richardson, *J. Phys. Chem.* 80, 164 (1976)
- (39) J. Nahlik-Wojcik, J. Wolinski, F. Karczynski, *RocznikiChimii. ann. soc. chim. Polonorum* 51, 461 (1977)
- (40) A.E. Martell, R.M. Smith, in *Critical Stability Constants*, vol. 1, Plenum Press, N.Y. 1974
- (41) R.P. Martin, in *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 2, éd. H. Sigel, Marcel Dekker, N.Y. 1974
- (42) F.A. Cotton, G. Wilkinson, *Advanced Inorganic Chemistry*, John Wiley and Sons, N.Y. 1972
- (43) R.B. Martin, in *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 1, éd. H. Sigel, Marcel Dekker, N.Y. 1974
- (44) J. Nahlik-Wojcik et col., *RocznikiChimiiann. Soc. Chim. Polonorum* 51, 1095 (1977)
- (45) J.M. Tsangaris, R.B. Martin, *JACS* 92, 4255 (1970)
- (46) D. Perret, non publié, Université de Neuchâtel (1980)
- (47) K. Bernauer, in *Metal Ions in Biological Systems*, vol. 1, éd. H. Sigel, Marcel Dekker, N.Y. (1974)
- (48) O. Yamanchi, Y. Nakao, A. Nakahara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 48, 2572 (1975)
- (49) T. Sakurai, O. Yamanchi, A. Nakahara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 49 169 (1976)
- (50) T. Sakurai, O. Yamanchi, A. Nakahara, *J.C.S. Chem. Comm.* 1976, 553

- (51) T. Sakurai, O. Yamauchi, A. Nakahara, J.C.S. Chem. Comm. 1977, 718
- (52) O. Yamauchi, T. Sakurai, A. Nakahara, Bull. Chem. Soc. Jpn. 50 1976 (1977)
- (53) T. Sakurai, O. Yamauchi, A. Nakahara, *ibid.* 51, 3203 (1978)
- (54) O. Yamanchi, T. Sakurai, A. Nakahara, JACS 101, 4164 (1979)
- (55) G. Brookes, L.D. Pettit, J.C.S. Dalton 1977, 1918
- (56) C.-Y. Yeh, F.S. Richardson, Inorg. Chem. 15, 682 (1976)
- (57) L.D. Pettit, J.W. Hefford, in Metal Ions in Biological Systems vol. 9, éd. H. Sigel, Marcel Dekker, N.Y. 1979
- (58) R. Nakon, R.J. Angelici, JACS 96, 4178 (1974)
- (59) A. Kaneda, A.E. Martell, JACS 99, 1586 (1977)
- (60) J.J. Czarnecki, D.W. Margerum, Inorg. Chem. 16, 1997 (1977)
- (61) E.A. Sullivan, Can. J. Chem. 57, 62 (1979)
- (62) R.D. Gillard, P. O'Brien, J. Inorg. Nucl. Chem. 40, 1671 (1972)
- (63) J.R. Gollgohy, C.J. Hawkins, C. Wong, Inorg. Nucl. Chem. Letters 6, 215 (1970)
- (64) A. Braibanti, F. Dallavalle, G. Mori, J. Inorg. Biochem. 10, 263 (1979)
- (65) W. Plemert, W. Heine, Normalwerte, 3^e éd. Veb Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1969
- (66) A.G. Ogston, Nature 162, 963 (1948)
- (67) H.E. Carter, R.L. Frank, H.W. Johnston, in Org. Synthesis, Coll. Vol. 3, p.167, John Wiley and Sons, N.Y. 1962)
- (68) M. Bergmann, L. Zervas, Ber. LXV, 1197 (1932)
- (69) W.D. John, G.T. Young, J. Chem. Soc. 1954, 2870
- (70) D.L. Buchanan, E.E. Haley, F.D. Dorer, B.J. Corcoran, Biochem. 5, 3240 (1966)
- (71) I.G. Kirchner, in Techniques of Organic Chemistry, vol. XII, p.326, éd. Interscience Pub. (1967)
- (72) T. Sakurai, A. Nakahara, Inorg. Chem. 19, 847 (1980)
- (73) D. Piémontesi, communication orale, Université de Neuchâtel (1980)

